



**FURG**

**Tese de Doutorado**

**Voltametria de Micropartículas Imobilizadas  
aplicada à análise direta de cosméticos e produtos de  
cuidado pessoal para a determinação de compostos  
orgânicos e chumbo**

---

**Juliana Villela Maciel**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2018**

**Voltametria de Micropartículas Imobilizadas  
aplicada à análise direta de cosméticos e produtos de  
cuidado pessoal para a determinação de compostos  
orgânicos e chumbo**

por

**JULIANA VILLELA MACIEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

Universidade Federal do Rio Grande  
Escola de Química e Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

**Voltametria de Micropartículas Imobilizadas  
aplicada à análise direta de cosméticos e produtos de  
cuidado pessoal para a determinação de compostos  
orgânicos e chumbo**

elaborada por

**JULIANA VILLELA MACIEL**

Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Doutor em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento (UFSM - RS)

---

Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho (UFSCar - SP)

---

Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG - RS)

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Daiane Dias – Orientadora (FURG - RS)

Rio Grande, 09 de Abril de 2018.

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”*

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTOS

---

---

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande, pela possibilidade da execução deste trabalho.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Daiane Dias**, seus ensinamentos foram além das relações formais e compromissos acadêmicos. Agradeço a confiança depositada durante o período do doutorado a amizade, carinho e apoio. Obrigada!

Ao Prof. Dr. **Orlando Fatibello-Filho**, pelo exemplo de profissional, por todos os ensinamentos e pela incansável orientação, paciência e incentivo, pelo carinho, apoio e dedicação. Obrigada!

Aos Profs. Dr. **Bruno Meira Soares** e Dr. **Paulo Cícero do Nascimento**, meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e participação na defesa da tese.

Aos Profs. Dr. **Márcio Raimundo Milani**, Dr<sup>a</sup>. **Ananda Guarda** e Dr<sup>a</sup>. **Cristiane Luisa Jost**, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

A mestranda, **Ana Munaretto** do LEEA, pela amizade, apoio e companheirismo, além do auxílio prestado nas atividades práticas que contribuíram de forma determinante para a execução deste trabalho.

Aos meus colegas do LEEA, em especial **João, Mônica, Diana, Sabrina, Leandro e Michele** pela amizade e incentivo.

Ao pessoal do LABBES, por toda a ajuda e apoio, e pelos momentos de descontração durante o nosso convívio.

Aos colegas **Elson Fava e Tiago Almeida** do LABBES, pelo importante apoio, companheirismo, conhecimento compartilhado e pela grande amizade construída neste período.

Às meninas, **Patrícia Deroco, Laís Pereira, Camila Proença, Thaísa Aparecida e Bruna Lourenção** pela amizade, apoio, carinho e companhia, tornando esta jornada mais prazerosa.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Hidroquímica, **Vandeco, Mônica, Carlos Andrade, Leonardo e Junior** pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos “alunos” da Hidroquímica, **Luane, Isadora, Isabela, Ray, Astolfo, Karelys, Gabriel, Camila, Giovane, Elis, Carlos e Michelle** pelo convívio de todos os dias, vocês fazem toda a diferença.

A secretária do PPGQTA **Rosane**, pela atenção e esclarecimentos nos assuntos relacionados a pós-graduação.

Ao meu marido, **Sérgio**, pelo carinho, paciência, incentivo, amor, confiança e companheirismo.

Aos meus irmãos **Francine e Matheus**, pelo carinho e amizade que nos une.

Aos meus pais, **Rodinei e Geneci**, por todos os ensinamentos, educação, dedicação, amor e apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada !

# SUMÁRIO

---

---

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xvi
RESUMO .....	xviii
ABSTRACT .....	xix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. OBJETIVO GERAL .....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	6
3.1. Análise voltamétrica combinada à imobilização de micropartículas e/ou microgotas .....	6
3.2. Aplicações da VIM .....	14
3.3. Determinação de HQ e EU em produtos de interesse farmacêutico e Pb em produtos de cuidado pessoal .....	16
3.3.1. Hidroquinona.....	16
3.3.2. Eugenol.....	17
3.3.3. Chumbo .....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
4.1. Instrumentação .....	21
4.2. Reagentes e soluções .....	23
4.3. Preparo das amostras .....	24
4.3.1. Creme dermatológico .....	24
4.3.2. Óleo de cravo .....	25
4.3.3. Tintura capilar .....	25
4.4. Otimização dos parâmetros experimentais e voltamétricos.....	26
4.4.1. Determinação de hidroquinona .....	26
4.4.2. Determinação de eugenol .....	27
4.4.3. Determinação de Chumbo .....	28

4.5. Desenvolvimento dos eletrodos de trabalho e métodos voltamétricos para determinação dos analitos de interesse .....	30
4.5.1. Preparação do HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE e determinação de HQ em creme dermatológico por VIM – Parte 1.....	31
4.5.2. Preparação do EU <sub>(imob.)</sub> -CB-DHP/GCE e determinação de EU em óleos de cravo por VIM – Parte 2 .....	32
4.5.3. Preparação do Pb <sub>(imob.)</sub> /CPE e determinação de Pb em tinturas capilares por VIM – Parte 3.....	34
4.6. Métodos comparativos para as determinações de HQ em cremes dermatológico, EU em óleos de cravo e Pb em tinturas capilares.....	35
4.7. Caracterização voltamétrica e morfológica dos eletrodos .....	37
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	38
5.1. PARTE 1 – Determinação de Hidroquinona.....	38
5.1.1. Otimização das condições experimentais .....	38
5.1.1.1. Seleção do filme.....	38
5.1.1.2. Efeito do eletrólito suporte e pH.....	40
5.1.2. Avaliação dos parâmetros por DPV .....	42
5.1.3. Resposta eletroquímica das moléculas de HQ imobilizadas .....	42
5.1.4. Validação do método e estabilidade do HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE .....	45
5.1.5. Estudo de interferente .....	50
5.1.6. Determinação de HQ em amostras de creme dermatológico .....	51
5.2. PARTE 2 – Determinação de eugenol .....	54
5.2.1. Otimização das condições experimentais .....	54
5.2.1.1. Seleção do filme.....	54
5.2.1.2. Efeito do pH.....	55
5.2.1.3. Seleção do eletrólito suporte e concentração.....	58
5.2.2. Avaliação dos parâmetros por SWV .....	59
5.2.3. Resposta eletroquímica das moléculas de eugenol imobilizadas em função da velocidade de varredura.....	60
5.2.4. Validação do método e estabilidade do EU <sub>(imob.)</sub> -CB-DHP/GCE .....	62
5.2.5. Estudo de interferente .....	64

5.2.6. Determinação de eugenol em amostras de produtos de higiene pessoal contendo óleo de cravo.....	65
5.3. PARTE 3 – Determinação de chumbo .....	68
5.3.1. Otimização das condições experimentais .....	68
5.3.1.1. Seleção do eletrodo .....	68
5.3.1.2. Avaliação do efeito do pH .....	73
5.3.1.3. Avaliação do efeito da composição e concentração do eletrólito.....	74
5.3.2. Avaliação dos parâmetros DPV .....	75
5.3.3. Avaliação da resposta eletroquímica do Pb imobilizado .....	76
5.3.4. Avaliação do desempenho analítico .....	78
5.3.5. Estudo de interferente.....	80
5.3.6. Determinação de Pb em amostras de tintas de cabelo .....	81
6. CONCLUSÕES .....	85
7. APÊNDICE.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação do procedimento de eletrografia (Adaptação SCHOLZ, 2015).....	6
<b>Figura 2.</b> Representação do sistema eletródico de três fases (Adaptação SCHOLZ, 2015).....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema de preparação do HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE.....	31
<b>Figura 4.</b> Esquema de preparação do EU <sub>(imob.)</sub> -CB-DHP/GCE. ....	32
<b>Figura 5.</b> Esquema de preparação do Pb <sub>(imob.)</sub> /CPE. ....	34
<b>Figura 6.</b> (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os filmes de CTS reticulada contendo CB (-) e pó de grafite (-) na presença de 40 ng de padrão de HQ imobilizada (condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 5), E <sub>inicial</sub> : -0,1 V; E <sub>final</sub> : +0,35 V; amplitude: 25 mV; t <sub>m</sub> : 50 ms e v: 5 mV s <sup>-1</sup> . <i>Inset</i> : Gráfico da I <sub>pa</sub> vs. material de carbono) e micrografias obtidas para (B) CB, (C) grafite e (D) filme de CTS reticulada contendo nanopartículas de CB.....	38
<b>Figura 7.</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o filme CTS reticulada contendo CB com 40 ng de HQ imobilizada em tampão fosfato 0,1; 0,2 e 0,4 mol L <sup>-1</sup> (pH 5). Condições experimentais: E <sub>inicial</sub> : -0,1 V; E <sub>final</sub> : +0,3 V; amplitude: 25 mV; t <sub>m</sub> : 50 ms e v: 5 mV s <sup>-1</sup> . <i>Inset</i> : Relação composição do eletrólito vs corrente de HQ. ....	41
<b>Figura 8.</b> Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica de 40 ng de HQ imobilizada em HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , E <sub>inicial</sub> : -0,1 V; E <sub>final</sub> : +0,35 V; amplitude: 25 mV; t <sub>m</sub> : 50 ms e v: 5 mV s <sup>-1</sup> . ....	41
<b>Figura 9.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE contendo 2,7, 5,4, 11, 16 e 24 ng de HQ imobilizada em tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 5) em um intervalo de potenciais entre -0,1 V e +0,35 V e v 50 mV s <sup>-1</sup> .....	43
<b>Figura 10.</b> Relação entre (A) I <sub>p</sub> vs v (B) I <sub>p</sub> vs raiz da v <sup>1/2</sup> (C) log I <sub>pa</sub> vs log v (D) I <sub>p</sub> vs v <sup>0,7</sup> do eletrodo modificado de HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE na presença de 11 ng de HQ imobilizada de 10 a 200 mV s <sup>-1</sup> . Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 5,0), E <sub>inicial</sub> : -0,1 V; E <sub>final</sub> : +0,35 V. ....	44
<b>Figura 11.</b> Voltamogramas de DPV contendo diferentes massas de HQ imobilizada (2,7, 5,4, 11, 16, 21,5, 27, 32, 38 e 43 ng) no HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> (pH 5), E <sub>inicial</sub> : -0,1 V; E <sub>final</sub> :	

- +0,3 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $\nu$ : 5 mV s<sup>-1</sup>. *Inset*: curva analítica ( $I_{pa}$  versus massa de HQ). ..... 45
- Figura 12.** Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) empregando o eletrodo modificado de HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE na presença de 11 ng de padrão de HQ imobilizada. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5), em um intervalo de potenciais entre -0,1 V e +0,3 e  $\nu$ : 50 mV s<sup>-1</sup>. ..... 47
- Figura 13.** Ilustração representativa da reação da HQ com quitosana reticulada com ECH (PAULIUKAITE, 2009). ..... 48
- Figura 14.** Esquema representativo da possível reação redox da HQ imobilizada no filme de quitosana reticulada com ECH contendo CB. .... 49
- Figura 15.** Avaliação da repetibilidade do HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE contendo 17 ng e 33 ng de HQ imobilizada. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,35 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $\nu$ : 5 mV s<sup>-1</sup>. ..... 49
- Figura 16.** Gráfico obtido empregando o eletrodo modificado de HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE na presença e na ausência dos possíveis interferentes (fluocinolona acetonide e a tretinoína). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,35 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $\nu$ : 5 mV s<sup>-1</sup>. ..... 51
- Figura 17.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos no HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE contendo 700 ng de creme dermatológico (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) imobilizado. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,3 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $\nu$ : 5 mV s<sup>-1</sup>. ..... 52
- Figura 18.** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para os filmes de DHP (-) e CTS reticulada (-) na ausência e na presença de 29 µg de padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 7), de -0,4 V a +0,8 V e  $\nu$ : 50 mV s<sup>-1</sup>. Imagens de MEV contendo EU imobilizado nos filmes de DHP (B) e CTS reticulada (C). ..... 54
- Figura 19.** Voltamogramas cíclicos do EU<sub>(imob.)</sub>-CB-DHP/GCE contendo 29 µg do padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> em diferentes valores de pH (2 a 9), em um intervalo de potenciais entre 0 V e +1,0 V e  $\nu$ : 50 mV s<sup>-1</sup>. *Inset*: relação da  $E_{pa}$  vs. pH. .... 55
- Figura 20.** Ilustração representativa da reação redox do EU (YILDIZ, 2017). ..... 56

- Figura 21.** Voltamogramas cíclicos do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 30, 60, 145 e 230  $\mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2), em um intervalo de potenciais entre 0 V e +1,0 V e  $\nu$ :  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 57
- Figura 22.** Reação redox do EU (ZIYATDINOVA *et al.*, 2013). ..... 58
- Figura 23.** (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 29  $\mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (a) e tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (b) em pH 2 (B) Gráfico do efeito da concentração do tampão fosfato (pH 2) em relação à resposta voltamétrica de 29  $\mu\text{g}$  de EU imobilizado. Condições experimentais:  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 70 mV; Frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5 mV..... 59
- Figura 24.** Voltamogramas cíclicos ( $\nu$ :  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) do eletrodo modificado  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  na ausência (-) e na presença (-) de 29  $\mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, obtidos em 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2), em um intervalo de potenciais entre 0 V e +1,0 V. .... 60
- Figura 25.** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2) empregando o eletrodo modificado de  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  com 20  $\mu\text{g}$  de EU imobilizado em (a) 10, (b) 20, (c) 50, (d) 80, (e) 100, (f) 200, (g) 300, (h) 400 e (i) 600  $\text{mV s}^{-1}$ . (*Inset*: gráfico  $I_p$  vs  $\nu$ ) (B) gráfico  $\log I_{pa}$  vs  $\log \nu$  e (C) gráfico  $\log I_{pc}$  vs  $\log \nu$ . .... 61
- Figura 26.** Voltamogramas de SWV contendo diferentes massas de EU imobilizado (0,03, 0,14, 0,29, 0,86, 1,4, 2,9, 4,6 6,9, 9,2, 11,0, 14,0, 17,0, 20,0, 23,0 e 26,0  $\mu\text{g}$ ) no  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$ . Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5mV. *Inset*: curva analítica ( $I_{pa}$  versus massa de EU)..... 62
- Figura 27.** Avaliação da repetibilidade do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 20  $\mu\text{g}$  de EU imobilizado. Condições experimentais SWV: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5mV. . 64
- Figura 28.** Influência do propilenoglicol no sinal de corrente anódico do padrão de EU no eletrodo de  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$ . Condições experimentais SWV: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5 mV..... 65

- Figura 29.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos no  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo  $8,6 \mu\text{g}$  de óleo de cravo ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ). Condições experimentais SWV: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5mV..... 66
- Figura 30.** Voltamogramas de pulso diferencial de Pb imobilizado obtidos para as pastas de carbono contendo parafina (a) e óleo mineral (b) em CB na presença de  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : 0 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 68
- Figura 31.** Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado utilizando os procedimentos 1 (a) e 2 (b). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : 0 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . ... 69
- Figura 32.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado em pasta de CB (a) e pó de grafite (b). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,2 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Imagens de MEV das pastas de (B) CB e (C) pó de grafite. .... 70
- Figura 33.** Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado na presença (a) e ausência de DHP (b) Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : 0 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 71
- Figura 34.** Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado no GCE (a) e no CPE (b). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,2 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 72
- Figura 35.** Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica de  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,2 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 73
- Figura 36.** Gráfico do efeito do eletrólito suporte sobre a resposta voltamétrica de  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado no eletrodo modificado ( $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$ ). Condições experimentais DPV: 15 mL de eletrólito suporte (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,4 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 74
- Figura 37.** Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado utilizando o tampão fosfato 0,1; 0,2 e  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5). Condições experimentais DPV: 15 mL de

- eletrólito suporte,  $E_{inicial}$ : -1,2 V;  $E_{final}$ : -0,4 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $v$ : 10 mV s<sup>-1</sup>. ..... 75
- Figura 38.** Voltamogramas cíclicos de 6,4 µg de Pb imobilizado em 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 mV s<sup>-1</sup> (*Inset* a relação entre  $I_{pa}$  (µA) vs  $v$  (mV s<sup>-1</sup>)). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -1,0 V e  $E_{final}$ : -0,2 V. .... 76
- Figura 39.** Gráfico log  $I_{pa}$  vs log  $v$  (mV s<sup>-1</sup>). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -1,0 V e  $E_{final}$ : -0,2 V. *Inset*: relação entre a  $I_{pa}$  vs  $v^{1/2}$ . .... 77
- Figura 40.** Voltamogramas de DPV contendo diferentes massas de Pb imobilizado (0,042, 0,16, 0,64, 1,3, 1,9, 2,5 e 3,2 µg) no Pb<sub>(imob.)</sub>/CPE. *Inset*: curva analítica ( $I_{pa}$  versus massa de Pb). Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -1,2 V;  $E_{final}$ : -0,4 V; amplitude: 70 mV;  $t_m$ : 0,02 s e  $v$ : 10 mV s<sup>-1</sup>. .... 78
- Figura 41.** (A) Avaliação da repetibilidade intra-dia do Pb<sub>(imob.)</sub>/CPE contendo 1,3 µg de Pb imobilizado (B) avaliação da repetibilidade inter-dia do Pb<sub>(imob.)</sub>/CPE contendo 2,5 µg de chumbo imobilizado. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -1,2 V;  $E_{final}$ : -0,4 V; amplitude: 70 mV;  $t_m$ : 0,02 s e  $v$ : 10 mV s<sup>-1</sup>. 80
- Figura 42.** Influência do cloreto de amônio e do propilenoglicol na resposta de corrente anódica de 3,2 µg de Pb imobilizado. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -1,2 V;  $E_{final}$ : -0,4 V; amplitude: 70 mV;  $t_m$ : 0,02 s e  $v$ : 10 mV s<sup>-1</sup>. .... 81
- Figura 43.** Gráfico das curvas de temperaturas de pirólise e atomização com 50 µg L<sup>-1</sup> de Pb, 5 µL da solução do modificador químico Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1000 µg L<sup>-1</sup>) em meio aquoso e na amostra (T<sub>1</sub>). .... 82

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Programa de temperatura para a determinação de Pb por HR-CS GF AAS.....	36
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros experimentais DPV investigados e valores selecionados.....	42
<b>Tabela 3.</b> Determinação de HQ utilizando diferentes técnicas voltamétricas .....	46
<b>Tabela 4.</b> Valores de HQ quantificados em amostras de creme dermatológico (A <sub>1</sub> e A <sub>2</sub> ), pelos métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n=3) .....	52
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros experimentais SWV investigados e valores selecionados.....	60
<b>Tabela 6.</b> Comparação entre os valores de LOD obtidos para o método voltamétrico proposto utilizando o EU <sub>(imob.)</sub> -CB-DHP/GCE e para outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura. ....	63
<b>Tabela 7.</b> Valores de EU quantificados em amostras de óleo de cravo (S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> e S <sub>3</sub> ), pelos métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n=3) .....	66
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros experimentais DPV investigados e valores selecionados.....	76
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre os valores de LOD obtidos para o método voltamétrico proposto utilizando o Pb <sub>(imob.)</sub> / CPE e para outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura. ....	79
<b>Tabela 10.</b> Programação utilizada para a determinação de Pb por HR-CS GF AAS....	83
<b>Tabela 11.</b> Valores de Pb quantificados em amostras de tinturas capilares (T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> e T <sub>3</sub> ), pelos métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n=3) .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

---

A	Amplitude, do inglês <i>Amplitude</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASDPV	Voltametria de Pulso Diferencial de Redissolução Anódica, do inglês <i>Anodic Stripping Differential Pulse Voltammetry</i>
CB	Negro de fumo, do inglês <i>Carbon black</i>
CTS	Quitosana, do inglês <i>Chitosan</i>
CV	Voltametria cíclica, do inglês <i>Cyclic Voltammetry</i>
DHP	Dihexadecil Hidrogenofosfato, do inglês <i>Dihexadecyl hydrogen phosphate</i>
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial, do inglês <i>Differential Pulse Voltammetry</i>
ECH	Epicloridrina, do inglês <i>Epichlorohydrin</i>
CPE	Eletrodo de pasta de carbono, do inglês <i>Carbon paste electrode</i>
EU	Eugenol, do inglês <i>Eugenol</i>
<i>f</i>	Frequência, do inglês <i>Frequency</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GA	Glutaraldeído, do inglês <i>Glutaraldehyde</i>
GCE	Eletrodo de carbono vítreo, do inglês <i>Glassy carbon electrode</i>
HQ	Hidroquinona, do inglês <i>Hydroquinone</i>
HR-CS GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua com forno de grafite, do inglês <i>High Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
$I_{pa}$	Corrente de pico anódico, do inglês <i>anodic peak current</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>

LSV	Voltametria de Varredura Linear, do inglês <i>Linear Sweep Voltammetry</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura, do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>
PIGE	Eletrodo de grafite impregnado com parafina do inglês <i>Paraffin Impregnated Graphite Electrode</i>
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative standard deviation</i>
SWASV	Voltametria de Redissolução Anódica de Onda Quadrada, do inglês <i>Square Wave Anodic Stripping Voltammetry</i>
SWV	Voltametria de Onda Quadrada, do inglês <i>Square Wave Voltammetry</i>
$t_m$	Tempo de modulação, do inglês <i>Modulation time</i>
V	Volt
$\nu$	Velocidade de varredura, do inglês <i>Scan rate</i>
VIM	Voltametria de micropartículas imobilizadas, do inglês <i>Voltammetry of Immobilized Microparticles</i>

## RESUMO

---

---

**Título: Voltametria de Micropartículas Imobilizadas aplicada à análise direta de cosméticos e produtos de cuidado pessoal para a determinação de compostos orgânicos e chumbo.**

Autor: Juliana Villela Maciel

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Daiane Dias

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de três novos eletrodos com base na técnica de Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM) combinada à imobilização por *drop coating*. Uma nova arquitetura baseada na imobilização da amostra na presença de filmes condutores contendo polímeros sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) assim como imobilização em eletrodo de pasta de carbono (CPE) foi aplicada neste trabalho. No primeiro eletrodo desenvolvido, partículas de hidroquinona (HQ) foram imobilizadas no filme de quitosana (CTS) reticulada com epiclоридrina (ECH) contendo nanopartículas de *carbon black* (CB) sobre o GCE. O eletrodo HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE foi aplicado à determinação de HQ em cremes dermatológicos por Voltametria de Pulso Diferencial (DPV), o qual apresentou um limite de detecção (LOD) de 0,045 ng. A determinação de eugenol (EU) em óleos de cravo foi feita por Voltametria de Onda Quadrada utilizando um GCE modificado com filme de dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) contendo CB e padrão de EU imobilizado (EU<sub>(imob.)</sub>-CB-DHP/GCE), o qual apresentou um LOD de 0,13 ng. Por fim, foi proposto o terceiro eletrodo (Pb<sub>(imob.)</sub>/CPE) através da imobilização do padrão de Pb sobre a superfície de um CPE, o qual foi utilizado para determinação de Pb em tinturas capilares por DPV, apresentando um LOD de 4 ng. Os eletrodos desenvolvidos mostraram-se adequados, em termos de repetibilidade, estabilidade e seletividade. A VIM combinada a imobilização por *drop coating* forneceu procedimentos com respostas rápidas e resultados confiáveis com baixos limites de detecção e boa precisão.

Palavras-chaves: Voltametria de micropartículas imobilizadas; Carbon black; Hidroquinona; Eugenol; Chumbo.

## ABSTRACT

---

---

**Title: Voltammetry of Immobilized Microparticles applied to the direct analysis of cosmetics and personal care products for organic compounds and lead determinations.**

Author: Juliana Villela Maciel

Advisor: Prof. Dr<sup>a</sup> Daiane Dias

In this work was proposed the development of three new electrodes based on the Voltammetry of Immobilized Microparticles (VIM) technique combined with immobilization by drop coating. A new architecture based on the sample immobilization in the presence of conductive films containing polymers on the surface of the glassy carbon electrode (GCE) as well as immobilization in carbon paste electrode (CPE) was evaluated. In the first electrode developed, hydroquinone particles (HQ) were immobilized in the chitosan cross-linked (CTS) with epichlorohydrin (ECH) film containing carbon black (CB) nanoparticles on the GCE. The electrode  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE was applied to HQ determination in dermatological creams by Differential Pulse Voltammetry (DPV) showing a detection limit (LOD) of 0.045 ng. Eugenol (EU) determination in clove oils was performed by Square Wave Voltammetry using a modified GCE with dihexadecyl hydrogenphosphate (DHP) film containing CB and immobilized EU standard ( $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE), showing a LOD of 0.13 ng. Finally, in the third electrode ( $Pb_{(imob.)}$ /CPE), hair dye samples were immobilized on the CPE surface, which was used to determine Pb by DPV, presenting a LOD of 4 ng. The developed electrodes were adequate in terms of repeatability, stability and selectivity. Hence, VIM combined with drop coating immobilization provides analysis with a fast response and reliable results with low detection limits and good accuracy.

**Keywords:** Voltammetry of Immobilized Microparticles; Carbon black; Hydroquinone; Eugenol; Lead.

# 1. INTRODUÇÃO

---

---

O primeiro estudo sobre análise direta de materiais no estado sólido usando as técnicas eletroanalíticas foi publicado em 1989 (SCHOLZ *et al.*, 1989), onde foi desenvolvido um sensor baseado em uma amostra sólida imobilizada em eletrodo de grafite impregnado com parafina (PIGE, do inglês *Paraffin Impregnated Graphite Electrode*).

A Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM, do inglês *Voltammetry of Immobilized Microparticles*) inicialmente chamada de Voltametria Abrasiva de Redissolução (AbrSV, do inglês *Abrasive Stripping Voltammetry*) (FIEDLER e SCHOLZ, 2005) foi desenvolvida com o objetivo de superar as dificuldades experimentais referentes aos estudos eletroanalíticos de substâncias sólidas. Essa técnica fornece respostas analíticas sensíveis utilizando massas muito pequenas de micropartículas imobilizadas (CARVALHO *et al.*, 2010 (a); DOMÉNECH-CARBÓ, 2013) e esta característica é contrastada com os métodos voltamétricos "convencionais", uma vez que o sinal analítico é devido aos processos redox que ocorrem na dupla camada e, portanto, uma pequena parte do analito é dissolvida para a solução (contendo o eletrólito suporte) (ZOSKI, 2007).

Na VIM, o sinal analítico obtido é uma resposta média de várias partículas imobilizadas na superfície do eletrodo, proporcionando um aumento do sinal através de uma quantidade muito pequena de analito imobilizado (KULESZA e COX, 1998; KOMORSKY-LOVRIČ *et al.*, 1999).

Existem muitos trabalhos que utilizam a VIM para a detecção de compostos orgânicos (MARTINI *et al.*, 2015; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2013), corantes (DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2010), pesticidas (REDDY, 1996), tanto para análises qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa (SCHOLZ *et al.*, 1991; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2003; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2004; CEPRIÁ *et al.*, 2005) podendo desta forma, ser uma alternativa para substituir métodos sofisticados de análise, que consomem tempo e custo elevados, normalmente sendo necessário etapas prévias de preparo de amostra.

Determinações eletroanalíticas podem ser feitas empregando-se eletrodos de Hg (AL-HOSSAINY *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2009), sólidos (TONELLO *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2013) e também eletrodos quimicamente modificados (TASHKHOURIAN *et al.*, 2016; AFZALI *et al.*, 2014; VICENTINI *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2018). Uma estratégia interessante no cenário da preparação dos eletrodos modificados é a associação de nanomateriais eletroativos com polímeros, obtendo-se assim, filmes condutores com excelentes aderências e alta robustez em substratos como carbono vítreo (ARDUINI *et al.*, 2011; VICENTINI *et al.*, 2014) além de possibilitar a utilização de diferentes materiais carbonáceos para o desenvolvimento de sensores e biossensores (VICENTINI *et al.*, 2014; WANG, 2005; SKRZYPCZYŃSKA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017). Em termos do desempenho eletroquímico e analítico, o *carbon black* (CB) apresenta propriedades interessantes para a análise eletroquímica (incluindo a VIM), devido à sua boa estabilidade química, excelente condutividade elétrica, grande área superficial e quando combinados com diferentes materiais (como polímeros), suas propriedades podem ser melhoradas (ARDUINI *et al.*, 2011; ARDUINI *et al.*, 2012; SILVA e FATIBELLO-FILHO, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Devido a estas excelentes propriedades, este material carbonáceo nanoestruturado tem sido usado em eletroanalítica como sensor e biossensor (VICENTINI *et al.*, 2015; ARDUINI *et al.*, 2015; PORTACCIO *et al.*, 2013), incluindo estudos sobre a determinação de compostos orgânicos fenólicos, como a hidroquinona (HQ) (ARDUINI *et al.*, 2015) e eugenol (EU) (AFZALI *et al.*, 2014) assim como compostos inorgânicos, como o Pb (VICENTINI *et al.*, 2014).

Por ser um forte agente de despigmentação, a HQ tem sido amplamente aplicada no campo de cosméticos, na produção de cremes dermatológicos, tendo como sua principal função a inibição da produção de melanina (YOSHIMURA *et al.*, 2001). Seu uso é indicado para clareamento da pele, na faixa de 2 a 5% m/m (TSE, 2010; GÓMEZ-TAYLOR *et al.*, 2004), porém o uso excessivo de HQ pode causar queimaduras, náuseas, dores abdominais, entre outros efeitos (YOSHIMURA *et al.*, 2001). O monitoramento da concentração de HQ é justificado devido à sua alta toxicidade e baixa degradabilidade no ambiente, mesmo em concentrações muito baixas (ALDRICH, 1990; GARCÍA *et al.*, 2005). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a concentração máxima admissível de HQ em produtos

de cuidados da pele é de 2% m/m, mas os níveis em produtos manipulados podem atingir até 4% m/m (ANVISA, 2000). Por outro lado, estudos e informações sobre o uso seguro de HQ foram publicados na agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*), indicando que a HQ pode atuar como agente cancerígeno, o que fez com que muitos países europeus proibissem seu uso com o objetivo de minimizar os riscos para a saúde pública (FDA, 2015).

O eugenol [1-hidroxi-2-metoxil-4-alilbenzeno] é um fenol orgânico semivolátil presente em óleo essencial do cravo-da-índia (usado no tratamento de unhas para o fortalecimento) e em produtos vegetais, como folhas de louro, canela e algumas outras espécies de ervas (SCHULZ *et al.*, 2008; YILDIZ *et al.*, 2017). Este composto é amplamente aplicado em várias áreas devido às suas excelentes propriedades, antioxidantes, antiinflamatórias, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas (KAMATOU *et al.*, 2012; JAGANATHAN e SUPRIYANTO, 2012; BOLASINA *et al.*, 2017). No entanto, há estudos que relatam que, em altas concentrações, o EU atua como um forte oxidante, causando um aumento da geração de radicais livres, podendo assim prejudicar os tecidos (MIYAZAWA e HISAMA, 2001). Portanto, seu monitoramento é importante pois em altas concentrações pode ser prejudicial para a saúde humana. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), a ingestão diária aceitável de EU é de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> por peso corporal para humanos (WHO, 1982).

Já o chumbo (Pb) pode ser encontrado em diversos produtos de higiene e cuidado pessoal principalmente em tinturas capilares, na forma de acetato de chumbo, devido a sua capacidade de cobrir os fios grisalhos (KIRKLAND *et al.*, 2005), podendo estar presente em elevadas concentrações. Entretanto, muitas vezes não há descrição das concentrações na formulação destes produtos, sendo sua presença atribuída diretamente aos corantes e pigmentos presentes na sua composição (DRAELOS, 2001). O Pb possui alta potencialidade tóxica devido a sua não biodegradabilidade, podendo se acumular nos organismos, acarretando riscos para saúde humana e também para o meio ambiente (HUANG *et al.*, 2014). A sua determinação é importante,

pois a contaminação por esse metal pode causar efeitos adversos aos seres humanos, incluindo graves alterações no sistema nervoso, cardiovascular, renal e reprodutivo (VICENTINI *et al.*, 2014). Segundo a ANVISA, o limite máximo permitido de acetato de chumbo em tintas de cabelo é 0,6 % (ANVISA, 2013).

Considerando a crescente procura de produtos direcionados à beleza e cuidados pessoais, a determinação de HQ em cremes dermatológico, de EU em óleos de cravo e Pb em tinturas capilares é de grande importância, de modo a assegurar que os produtos oferecidos aos consumidores estejam dentro das normas de segurança, não causando riscos a saúde humana.

Para a determinação desses compostos, a VIM é uma alternativa no desenvolvimento de métodos de análise, pois possibilita a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, podendo ser aplicada em diferentes amostras, inclusive, as que apresentam baixa solubilidade em meio aquoso.

Assim, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de três eletrodos através da imobilização do analito alvo sobre a superfície de um substrato. As determinações de HQ e EU em produtos de interesse farmacêutico foram realizadas através da combinação de filmes poliméricos e CB (contendo a amostra) imobilizados sobre a superfície GCE utilizando as técnicas Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) e Voltametria de Onda Quadrada (SWV), respectivamente. Para a análise de Pb em tinturas capilares, a imobilização da amostra foi feita sobre a superfície de um eletrodo de pasta de carbono e a determinação foi realizada através da DPV.

## 2. OBJETIVOS

---

---

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos eletroanalíticos para a determinação de compostos orgânicos e chumbo em amostras de interesse farmacêutico e de cuidado pessoal empregando a Voltametria de Micropartículas Imobilizadas combinada à imobilização por *drop coating*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar a composição dos eletrodos de trabalho;
- Avaliar o efeito do eletrólito suporte e pH na resposta eletroanalítica dos analitos imobilizados;
- Avaliar a influência dos parâmetros instrumentais voltamétricos (faixa de potencial de trabalho, tempo de modulação ( $t_m$ ), amplitude (A) e velocidade de varredura ( $v$ ), frequência ( $f$ ) e potencial step ( $E_{step}$ )) na resposta voltamétrica dos analitos imobilizados;
- Avaliar a cinética reacional dos analitos imobilizados;
- Avaliar o efeito dos interferentes;
- Avaliar a estabilidade, repetibilidade dos eletrodos desenvolvidos;
- Aplicar o método otimizado e validado nas amostras de creme dermatológico, óleo de cravo e tinturas capilares;

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

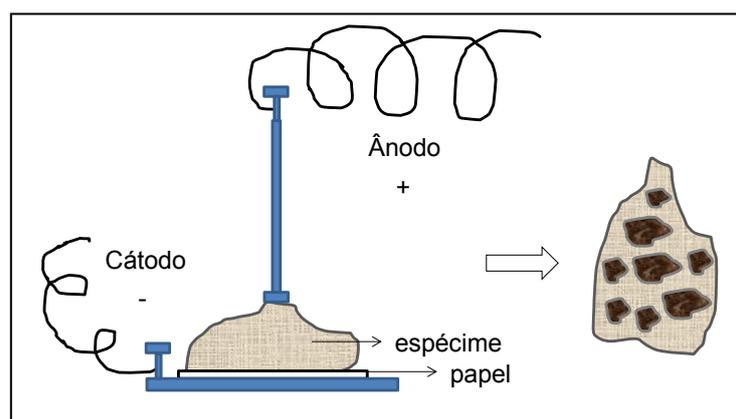
---

---

#### 3.1. Análise voltamétrica combinada à imobilização de micropartículas e/ou microgotas

Estudos eletroquímicos precursores aplicados à análise direta de sólidos foram realizados por volta de 1929 utilizando a eletrografia e na Figura 1 é possível visualizar o esquema representativo envolvido no procedimento desse processo (SCHOLZ, 2015).

**Figura 1.** Representação do procedimento de eletrografia (Adaptação SCHOLZ, 2015).



A eletrografia baseia-se em um processo de “impressão” no qual a amostra (material sólido a ser analisado) é pressionada em um papel embebido com uma solução eletrolítica (contendo o reagente que irá reagir com o analito) podendo ser visto claramente a distribuição do elemento reativo na superfície da amostra (SCHOLZ, 2015).

Apesar de obsoleta, esta técnica foi muito importante na identificação eletroquímica de minerais em amostras sólidas (SCHOLZ, 2015; WEISZ, 1970; SCHOLZ e MEYER, 1994). Contudo, a análise de sólidos por meio de métodos eletroquímicos recebeu maior atenção após o surgimento de eletrodos de pasta de carbono (CPE, do inglês *Carbon Paste Electrode*) introduzidos por Adams e Kuwana *et*

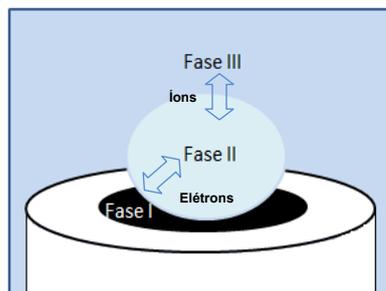
al. na década de 1960 (ADAMS, 1958; KUWANA e FRENCH, 1964; SCHULTZ e KUWANA, 1965).

Um dos problemas enfrentados pelos pesquisadores na análise direta de sólidos inicialmente foi à escolha do material condutor adequado (SCHOLZ, 2015). Diante de tal situação, pode-se destacar alguns obstáculos, como sólidos com condutividade elétrica insuficiente para ser usado como eletrodo, passivação na superfície do eletrodo que promove a diminuição da atividade causada pela formação de um filme não reativo sobre a superfície eletródica e difícil fabricação de eletrodos utilizando sólidos raros (por exemplo, certos minerais) (SCHOLZ e LANGE, 1992). Além disso, os voltamogramas de materiais sólidos são geralmente mais complexos do que aqueles das espécies dissolvidas (SCHOLZ e LANGE, 1992).

Em 1989, *Scholz et al.* (SCHOLZ *et al.*, 1989) conseguiram superar algumas dificuldades experimentais referentes aos estudos eletroquímicos de substâncias sólidas através da aplicação de um eletrodo de grafite impregnado com parafina (PIGE, do inglês *Paraffin Impregnated Graphite Electrode*) tornando-se pioneiros na análise direta de materiais em estado sólido usando as técnicas eletroanalíticas, através da aplicação da Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM, do inglês *Voltammetry of Immobilized Microparticles*) inicialmente chamada de Voltametria Abrasiva de Redissolução (AbrSV, do inglês *Abrasive Stripping Voltammetry*). Esta técnica foi desenvolvida inicialmente com o objetivo de obter informações sobre a composição química e mineralógica dos materiais sólidos imobilizados no eletrodo, porém atualmente é possível obter informações sobre o comportamento eletroquímico do sistema e análise quantitativa em diferentes materiais (FIEDLER e SCHOLZ, 2005).

Na VIM, as espécies eletroativas e/ou amostra encontram-se imobilizadas sobre a superfície de um eletrodo sólido adequado, o qual é imerso em um eletrólito suporte. As reações eletroquímicas neste sistema se processam na interface eletrodo/composto/solução, mostrados na Figura 2.

**Figura 2.** Representação do sistema eletródico de três fases (Adaptação SCHOLZ, 2015).



A reação eletroquímica neste sistema trifásico ocorre da seguinte forma: simultaneamente ocorre a transferência de elétrons entre as Fases I (condutor) e II (analito ou composto imobilizado) e troca de íons entre as Fases II e III (solução do eletrólito), ou seja, as espécies eletroativas presentes na amostra imobilizada trocam elétrons com o condutor e íons com a solução do eletrólito (SCHOLZ, 2015). A descrição cinética de um sistema trifásico é bastante complexa, uma vez que alguns aspectos devem ser levados em consideração, como: (i) a cinética da transferência de elétrons, (ii) a cinética da transferência de íons, (iii) a condutividade iônica da fase imobilizada, e (iv) o tamanho e forma da fase imobilizada. Desta forma, considerando a complexidade dos pontos descritos anteriormente, há poucos estudos relacionados à cinética de eletrodos trifásicos com partículas e/ou gotas imobilizadas (SCHOLZ, 2015).

A exposição direta das partículas e/ou gotas imobilizadas neste sistema fornece um aumento da resposta analítica, através de uma quantidade muito pequena de analito e/ou amostra imobilizada (KULESZA e COX, 1998; KOMORSKY-LOVRIČ *et al.*, 1999). Esta característica contrasta com os métodos voltamétricos "convencionais" (espécie eletroativa encontra-se dissolvida no eletrólito suporte, onde ocorre a difusão da espécie e um processo de oxidação e/ou redução pode ocorrer na superfície do eletrodo de trabalho) (MOSCOSO *et al.*, 2017), uma vez que o sinal analítico provém dos processos redox que ocorrem na dupla camada elétrica e, portanto, uma pequena parte do analito imobilizado é dissolvido para a solução contendo o eletrólito suporte (ZOSKI, 2007). O sinal analítico obtido na VIM é uma resposta média de várias partículas imobilizadas na superfície do eletrodo e informações sobre os compostos eletroativos presentes na amostra são obtidos de forma rápida, sem a necessidade das etapas de aplicação de um potencial e tempo de deposição (MACIEL *et al.*, 2017). Os

dados são obtidos apenas através da variação de potenciais que proporcionam o surgimento de picos de corrente, correspondentes às reações eletroquímicas envolvidas no sistema.

O método de preparação de amostras sólidas em análises convencionais geralmente é realizado por decomposição por via úmida ou seca para compostos orgânicos ou dissolução ácida para sólidos inorgânicos (KRUG, 2010), o qual dependendo da complexidade da matriz pode ser demorado, podendo levar a erros sistemáticos como contaminação ou perdas por volatilização afetando diretamente na exatidão e precisão dos resultados (DADFARNIA *et al.*, 2010).

Do ponto de vista analítico, a análise direta de sólido (sem a necessidade de preparo de amostra ou com o mínimo tratamento prévio) é uma alternativa interessante quando comparada aos procedimentos convencionais, uma vez que os riscos de contaminação são minimizados devido a pouca manipulação e exposição ao ambiente e o menor consumo de reagente resultando em uma menor geração de resíduos e investimentos financeiros.

Neste contexto a VIM merece destaque por ser uma técnica versátil aplicada em análises qualitativa e quantitativas (REDDY, 1996; SCHOLZ *et al.*, 1991; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2010; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2004; CEPRIÁ *et al.*, 2005) em amostras sólidas (MARTINI *et al.*, 2015; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2013; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2003) e dispersas (MACIEL *et al.*, 2017), bem como em caracterizações de processos redox (JOVANOVIĆ *et al.*, 2016; SEDANO *et al.*, 2004; DOMÉNECH *et al.*, 2012), podendo ser uma alternativa para substituir métodos sofisticados de análise, que normalmente possuem custo elevado e instrumentação complexa, sendo necessário na maioria dos casos etapas prévias de preparo de amostra.

Para a medida eletroquímica utilizando a VIM, as partículas da amostra devem estar em contato elétrico com o eletrodo e também com a fase da solução fornecedora de íons (SCHOLZ, 2015). Além disso, a escolha do eletrólito suporte e do eletrodo de trabalho influenciam diretamente no sistema eletródico trifásico uma vez que a escolha vai depender da natureza do composto estudado e do processo envolvido no sistema eletródico (SCHOLZ, 2015). Um pré-requisito para a escolha da solução do eletrólito é a insolubilidade ou pelo menos uma baixa solubilidade do composto estudado na

solução, sendo este um dado marcante na aplicabilidade da eletroquímica em estado sólido (CARVALHO *et al.*, 2010 (a); DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2012).

Vários materiais podem ser utilizados como eletrodo, porém a seleção do material está relacionada com a habilidade da amostra em aderir-se na superfície do eletrodo e também na forma de imobilização utilizada na preparação do eletrodo (SCHOLZ, 2015). Através de uma revisão sobre os fundamentos que envolvem a determinação voltamétrica de materiais sólidos e suas principais aplicações na eletroanalítica, podemos destacar a utilização dos eletrodos de grafite, PIGE, CPE, carbono vítreo, dentre outros materiais sólidos (CARVALHO *et al.*, 2010 (a)).

Dentre esses materiais, o PIGE tornou-se o material mais utilizado como eletrodo na VIM (SCHOLZ, 2015) constituído de grafite de alta pureza, cujos poros são preenchidos com parafina para prevenir altas correntes de fundo e a contaminação do eletrodo de trabalho através da penetração da solução do eletrólito (CARVALHO *et al.*, 2010 (a)). Sua preparação para utilização é simples sendo inicialmente a superfície do eletrodo lixada com uma lixa de 60 mm e após polida sobre a superfície de um papel sulfite, com a finalidade de obter uma superfície lisa sem ranhuras (SCHOLZ, 2015).

No trabalho pioneiro desenvolvido por SCHOLZ *et al.* (SCHOLZ *et al.*, 1989) foram imobilizados mecanicamente diferentes ligas de chumbo-antimônio ( $10^{-8}$  g de amostra) na superfície do PIGE e analisadas por Voltametria de Pulso Diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*).

Jovanović *et al.* (JOVANOVIĆ *et al.*, 2016) avaliaram o comportamento eletroquímico da capsaicina em pimentas (2 mg) utilizando o PIGE por SWV e CV.

Novak *et al.* (NOVAK *et al.*, 2013) desenvolveram um método para a detecção de canabinoides por DPV e SWV em amostras de maconha, chás de cânhamo e folhas de cânhamo usando o PIGE. A utilização da VIM neste estudo mostrou-se interessante tanto no ponto de vista químico quanto econômico, pois o método desenvolvido pode ser usado em análise rápida, apresentando um custo relativamente baixo quando comparado com outras técnicas analíticas como, por exemplo, a cromatografia.

Dentre as propriedades que tornam o PIGE interessante do ponto de vista eletroquímico, podemos destacar a alta inércia química com uma ampla janela de potencial, baixo custo, facilidade de processamento e porosidade adequada que permite uma boa "aderência" mecânica da amostra sobre a superfície do eletrodo

(SCHOLZ, 2015). Além disso, a limpeza da superfície do eletrodo é fácil podendo ser feita através da remoção por abrasão ou corte, tornando esse material atrativo e com um desempenho interessante, justificando assim a sua ampla utilização nas análises voltamétricas envolvendo a VIM (DOMÉNECH *et al.*, 2013; JOVANOVIĆ *et al.*, 2016; NOVAK *et al.*, 2013; KOMORSKY-LOVRIC *et al.* 2004).

A introdução da pasta de carbono e suas principais aplicações começaram a ser estudadas no final da década de 50 (ADAMS, 1958), sendo no início dos anos 80 o marco na história com o desenvolvimento de um sensor modificado com dimetilglioxima aplicado na determinação de  $Ni^{2+}$ . Através desse estudo foi observado que o uso do reagente seletivo clássico proporcionou um aumento da seletividade do eletrodo (RAVICHANDRAN e BALDWIN, 1981).

Neste tipo de eletrodo, a amostra na forma de pó pode ser misturada com o aglutinante e com o material condutor, por exemplo, o pó de grafite. O aglutinante deve ser imiscível na solução do eletrólito, possuir elevada pureza e baixa volatilidade e não ser eletroativo. Sua função principal é fixar a pasta ao eletrodo, preencher as cavidades entre as partículas do condutor e isolar o mesmo do contato com a solução do eletrólito (WANG, 2000). Já o condutor deve ser um material quimicamente inerte, apresentar baixa resistência e baixa corrente de fundo. Os materiais comumente utilizados como condutores são o pó de grafite (ALAQAD *et al.*, 2018; CHAUHAN e CHAWLA, 2016), nanotubos de carbono (SILVA *et al.*, 2015; WILDGOOSE *et al.*, 2006), carbon black (TALARICO *et al.*, 2016; KAROUSOS *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2018), entre outros. Esses materiais formam fases condutoras ideais na elaboração dos eletrodos de pasta.

Na literatura são encontradas diversas estratégias para a construção dos eletrodos modificados, sendo principalmente empregadas nos estudos de interações de sólidos com espécies dissolvidas (VICENTINI *et al.*, 2014; JANEGITZ *et al.*, 2009; ALAQAD *et al.*, 2018; SÝS *et al.*, 2017). A aplicação dos eletrodos de pasta modificados contendo a amostra incorporada é limitada devido a dificuldades na preparação destes eletrodos, a qual compreende uma etapa demorada e tediosa, dificultando a aplicação em análise de rotina e, além disso, em alguns casos podem surgir problemas relacionados à influência do aglutinante sobre a eletroquímica do composto incorporado (SCHOLZ, 2015).

Já a utilização do eletrodo de carbono vítreo é menos indicado na VIM, pois dependendo da forma de imobilização utilizada são encontradas dificuldades referentes à baixa aderência das partículas sólidas na superfície do eletrodo (CARVALHO *et al.*, 2010 (a); SCHOLZ, 2015). Assim, diferentes materiais carbonáceos são estudados no desenvolvimento de novos sensores e biossensores, sendo utilizados em diferentes aplicações (ARDUINI *et al.*, 2011; VICENTINI *et al.*, 2014; WANG, 2005; SKRZYPCZYNSKA *et al.*, 2016). Em termos de desempenho eletroquímico, o CB possui propriedades interessantes, devido à sua boa estabilidade química, excelente condutividade elétrica, grande área superficial e quando combinado com diferentes materiais (como polímeros), suas propriedades podem ser melhoradas (ARDUINI *et al.*, 2012; SILVA e FATIBELLO-FILHO, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

Uma estratégia no cenário de preparação de eletrodos modificados é a combinação de nanomateriais eletroativos com polímeros (por exemplo, DHP e CTS reticulada), usados com a finalidade de melhorar a aderência do filme em substratos de carbono vítreo (JANEGITZ *et al.*, 2015) garantindo a alta robustez do eletrodo modificado.

O DHP é um surfactante hidrofóbico constituído de duas longas cadeias carbônicas apolares ligadas ao grupo fosfato (GARCIA *et al.*, 2013). Quando disperso em água por agitação ultrassônica, o DHP pode fornecer uma película muito estável sobre superfícies de eletrodos de carbono vítreo e, devido a essa característica, tem sido amplamente utilizado para o desenvolvimento de sensores (ARDILA *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2006; JANEGITZ *et al.*, 2011) e biossensores (VICENTINI *et al.*, 2013).

A CTS é um biopolímero amplamente utilizado em eletroanalítica no desenvolvimento de eletrodos modificados, devido a alta resistência mecânica e custo relativamente baixo, pois é obtida a partir da quitina (material biodisponível) (VICENTINI *et al.*, 2014; JANEGITZ *et al.*, 2011). Além disso, quando a quitosana é reticulada, exhibe excelente aderência em substratos de carbono vítreo, o que garante uma alta robustez para os eletrodos modificados (WONG *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a combinação de materiais à base carbono com filmes poliméricos têm sido amplamente utilizada para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos em solução (ARDILA *et al.*, 2014; VICENTINI *et al.*, 2014;

JANEGITZ *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2016; SIMIONI *et al.*, 2014; TAKEDA *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2017).

Tendo em vista estas informações, utilizar esses materiais pode ser uma estratégia interessante na imobilização de amostras sólidas ou compostos de baixa solubilidade na superfície do GCE para análise por VIM, porém a fim de garantir um alto desempenho eletroquímico e analítico é necessário usar conjuntamente um material condutor, não só para ajudar na imobilização da amostra, mas também para facilitar a condução de elétrons.

Na VIM, a imobilização da amostra no eletrodo sólido pode ser feita de diferentes formas (SCHOLZ, 2015), sendo a imobilização por fricção do eletrodo sobre a amostra (SCHOLZ *et al.*, 1989) um procedimento de imobilização simples e bastante utilizado para ensaios diretos de sólidos devido à facilidade da preparação do eletrodo, necessitando apenas que a amostra esteja na forma de um pó fino, a qual será colocada em uma superfície plana. Após, a superfície do PIGE será pressionada durante alguns segundos sobre a amostra, resultando na fixação de partículas da amostra no eletrodo (CARVALHO *et al.*, 2010 (a); SCHOLZ, 2015).

Esse procedimento apresenta vantagens devido à facilidade de preparação do eletrodo, utilizando uma pequena quantidade de amostra sem nenhuma necessidade de dissolução, além de ser uma análise rápida e de custo relativamente baixo. Entretanto, apesar das vantagens acima descritas, a quantidade da amostra imobilizada não é controlada, apresentando desta forma uma desvantagem. Porém esta desvantagem, não torna este procedimento menos interessante, pois informações relevantes como o *screening* da amostra e processos redox envolvidos no sistema podem ser obtidas com sucesso (MARTINI *et al.*, 2015; SEDANO *et al.*, 2004; DOMÉNECH *et al.*, 2013).

A imobilização da amostra na forma líquida ou em suspensão pode ser realizada através da imersão do eletrodo em uma solução contendo o padrão e/ou amostra (MOSCOSO *et al.*, 2017) ou por *drop coating* onde a deposição de micropartículas e/ou microgotas de uma suspensão ou dispersão é feita de forma direta na superfície do eletrodo.

Nessa perspectiva o procedimento de *drop coating* mostra-se bastante adequado, uma vez que possibilita o controle da massa de amostra imobilizada na

superfície do eletrodo (MACIEL *et al.*, 2017), ou seja, uma solução contendo o analito e/ou amostra é depositada sobre a superfície do eletrodo sólido e após a imobilização das micropartículas e/ou microgotas da amostra na superfície do eletrodo o solvente é evaporado e o eletrodo aplicado na análise voltamétrica.

Em relação às técnicas de medição, não há limitação, várias técnicas eletroquímicas podem ser aplicadas a VIM e também combinadas com técnicas não eletroquímicas (SCHOLZ, 2015).

A voltametria cíclica é uma técnica amplamente utilizada para obtenção de informações qualitativas em reações eletroquímicas, podendo ser útil na VIM em estudos preliminares relacionados ao potencial redox das espécies eletroativas e no comportamento eletroquímico do sistema. Adicionalmente, pode ser utilizada para estudar a reversibilidade do processo eletródico, bem como obter informações sobre a ocorrência e estabilidade dos radicais e intermediários formados pela redução de espécies eletroativas (BRETT e BRETT, 1993) e quando combinada com outras técnicas de caracterização tais como as microscópicas e espectroscópicas pode fornecer informações analíticas relevantes no âmbito do conhecimento nas áreas de arqueologia, conservação e restauração, além de possibilitar em alguns casos o monitoramento “*in situ*” das reações de estado sólido (DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2013).

Já as técnicas de pulso, como DPV e SWV são amplamente empregadas com a finalidade de obter informações quantitativas em estudos de compostos orgânicos e inorgânicos. As etapas de redissolução são geralmente utilizadas para melhorar à sensibilidade das técnicas voltamétricas e são comumente aplicadas em análises utilizando a voltametria “convencional”, principalmente quando o analito encontra-se em baixas concentrações. Na VIM essa etapa é desnecessária, resultando assim uma análise mais rápida.

### **3.2. Aplicações da VIM**

A aplicação da VIM constitui um campo de pesquisa ativo e crescente desde o início da década de 90, sendo amplamente utilizada em análises de amostras sólidas, semi-sólidas e líquidas, como minerais (DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2004); pigmentos

(CEPRIÁ *et al.*, 2005), obras de arte (DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2015); cosméticos (PÉREZ-ARANTEGUI e CEPRIÁ, 2014), fármacos em pó (CARVALHO *et al.*, 2010 (b)), cremes dermatológicos (MACIEL *et al.*, 2017), alimentos (JOVANOVIĆ *et al.*, 2016; DOMÍNGUEZ e DOMÉNECH-CARBÓ, 2015) entre outros, incluindo o estudo de uma variedade de compostos, como compostos orgânicos e inorgânicos (MARTINI *et al.*, 2015; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2013; REDDY, 1996; DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2010).

Komorsky-Lovric *et al.* descrevem um método que envolve a aplicação da VIM utilizando o PIGE e SWV para a determinação de cocaína em papéis de células de moedas contaminadas (KOMORSKY-LOVRIC *et al.* 1999). Outro trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa foi a determinação de ciprofloxacina, azitromicina (antibiótico), e 5-aminossalicílico (antiinflamatório) em formulações farmacêuticas utilizando o PIGE e as técnicas SWV e CV (KOMORSKY-LOVRIC *et al.* 2004).

Doménech *et al.* aplicaram a VIM para identificar produtos de corrosão em material arqueológico datado no século IV a.c, uma vez que a identificação dos produtos de corrosão formados em objetos metálicos é uma tarefa essencial em sistemas arqueológicos para implementar procedimentos de proteção, conservação e restauração desses materiais. Neste trabalho foram mapeados os produtos de corrosão como, akaganeite, goethita, hematita, jarosite, magnetita, maghemita e siderite em artefatos de ferro e as análises foram feitas utilizando o PIGE e SWV (DOMÉNECH *et al.*, 2013). Outro trabalho publicado por esse grupo de pesquisa foi um estudo de identificação de falsificações de chumbo arqueológico usando a VIM combinada com técnicas não eletroquímicas como, a microscopia eletroquímica de varredura, auxiliada por microscopia óptica convencional e microscopia eletrônica de varredura (DOMÉNECH-CARBÓ *et al.*, 2015).

Cepriá *et al.* usaram a VIM para identificar pigmentos de cádmio (sulfeto de cádmio e sulfoseleneto de cádmio) em tintas com PIGE e SWV (CEPRIÁ *et al.*, 2005) e Sedano *et al.* estudaram o comportamento eletroquímico de diferentes amostras sólidas, como  $\text{Cu}_2\text{O}_{(s)}$ ,  $\text{CuO}_{(s)}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3_{(s)}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4_{(s)}$  e suas misturas binárias, usando a VIM em CPE e CV (SEDANO *et al.*, 2004).

### 3.3. Determinação de HQ e EU em produtos de interesse farmacêutico e Pb em produtos de cuidado pessoal

#### 3.3.1. Hidroquinona

A hidroquinona (1,4-dihidroxibenzeno) é amplamente utilizada em processos biológicos e industriais (creme dermatológico, produção de alcatrão de hulha, fabricação de papel, estabilizador de tintas e vernizes ou em desenvolvimento de filmes fotográficos) (LUPETTI *et al.*, 2006; GANESH e SWAMY, 2016). Tem sido amplamente aplicada no campo dos cosméticos por ser um forte agente de despigmentação tendo como principal função a inibição da produção da melanina (YOSHIMURA *et al.*, 2001) e seu uso é indicado para clareamento da pele na faixa de concentração de 2 a 5% m/m (TSE, 2010; GÓMEZ-TAYLOR *et al.*, 2004). Entretanto, o excesso de hidroquinona (HQ) pode causar efeitos adversos à saúde como queimaduras na pele, náuseas, dores abdominais, convulsões, entre outros (YOSHIMURA *et al.*, 2001). Devido à sua alta toxicidade e baixa degradabilidade no meio ambiente, o seu monitoramento é justificado mesmo quando presente em concentrações muito baixas (ALDRICH, 1990; LÓPEZ *et al.*, 2005). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a concentração máxima admissível de HQ em produtos de cuidados para a pele é de 2% m/m, porém os níveis em produtos manipulados podem chegar até 4% m/m (ANVISA, 2000). A Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*), indica que este composto pode atuar como agente cancerígeno. Além disso, em muitos países europeus o uso da HQ é proibido como forma de prevenção à saúde (FDA, 2015).

A determinação de HQ em diferentes tipos de amostra tem sido proposta utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com diferentes detectores (DUBES *et al.*, 1983; SKRZYPCZAK-PIETRASZEK *et al.*, 2017; PRYOR *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2005) e espectrofotometria (AFKHAMI *et al.*, 2001; MEDIEN *et al.*, 2001). Cabe salientar que, para a utilização destas técnicas de análise são necessários equipamentos de alto porte (no caso da cromatografia) e em alguns casos, o tempo de análise é longo devido ao preparo da amostra. Sendo assim, torna-se relevante o

desenvolvimento de métodos alternativos simples, econômicos e rápidos para a determinação da HQ.

Neste sentido, a voltametria tem sido uma alternativa na determinação da HQ, uma vez que apresenta vantagens como análise direta da amostra ou apenas tratamentos simples, eliminando as etapas mais sofisticadas de preparo de amostra (MACIEL *et al.*, 2017).

Levando em consideração a boa eletroatividade da HQ, diversos trabalhos são reportados na literatura aplicando técnicas voltamétricas para a determinação de HQ em formulações farmacêuticas e amostras ambientais destacando o uso de eletrodo impresso à base de grafeno (ARAGÓ *et al.*, 2016), filmes poliméricos à base de materiais carbonáceos (YIN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2017), eletrodos de carbono vítreo com diferentes modificações (ZHANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2011), eletrodos modificados de pasta de carbono (KUSKUR *et al.*, 2017; TASHKHOURIAN *et al.*, 2016) e biossensores de pasta de carbono modificado com tecido da batata doce (*Ipomoea batatas (L.) Lam.*) (VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 2000).

A potencialidade da combinação da VIM e a imobilização da amostra por *drop coating* pode ser observada no trabalho desenvolvido por Maciel *et al.* (MACIEL *et al.*, 2017), onde um eletrodo de GCE modificado com filme de quitosana reticulada com ECH contendo CB e padrão de hidroquinona e/ou amostra de creme dermatológico imobilizado forneceu procedimento com resposta rápida e resultados confiáveis com baixos limites de detecção e boa precisão.

### **3.3.2. Eugenol**

O eugenol (EU) é um fenol orgânico semi-volátil e apresenta algumas características como baixa solubilidade em água, odor forte e quando exposto à luz sofre oxidação alterando sua cor (de incolor a amarelo claro) (PUBCHEM, 2018). É o principal componente do óleo essencial de cravo e também pode estar presente em alguns vegetais, como folhas de louro, canela, noz-moscada e algumas outras espécies de ervas (SCHULZ *et al.*, 2008; YILDIZ *et al.*, 2017). É amplamente aplicado em vários setores industriais (SAĞLAM *et al.*, 2016) devido às suas excelentes

propriedades antimicrobianas, antivirais, anti-helmínticas, antimutagênicas, antigenotóxicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígena (KAMATOU *et al.*, 2012; JAGANATHAN e SUPRIYANTO, 2012; BOLASINA *et al.*, 2017; COWING *et al.*, 2015). Além disso, pode desempenhar um papel importante como neuroprotetor (PISANO *et al.*, 2007) podendo também ser empregado na produção de outros compostos fenólicos como a vanilina (ASHENGROPH *et al.*, 2011).

No entanto, há trabalhos na literatura que relatam que em altas concentrações o EU pode atuar como um forte oxidante, gerando um aumento de radicais livres, os quais podem prejudicar os tecidos (MIYAZAWA e HISAMA, 2001). Neste sentido, é importante determinar sua concentração em produtos como alimentos e medicamentos, pois em altas concentrações ele pode ser prejudicial para a saúde humana. Segundo os órgãos de controle de saúde (Organização Mundial da Saúde - WHO, do inglês *World Health Organization*) e alimentação (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a ingestão diária aceitável de EU é de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  por peso corporal para humanos (WHO, 1982).

Em relação aos métodos de análise e quantificação do EU em formulações farmacêuticas e em amostras ambientais, são encontrados na literatura trabalhos envolvendo o uso da cromatografia líquida com diferentes detectores (KE *et al.*, 2016; SARAN *et al.*, 2013; DHOOT *et al.*, 2009; BEAUDRY *et al.*, 2006), espectrofotometria UV-vis (PRAMOD *et al.*, 2013) e métodos eletroquímicos (SAĞLAM *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016; FENG *et al.*, 2014; AFZALI *et al.*, 2014).

Os métodos cromatográficos são relativamente satisfatórios, no entanto, os instrumentos envolvidos são muitas vezes caros e requerem um custo elevado de manutenção, além disso, o preparo da amostra envolvido é geralmente complicado e demorado (SAĞLAM *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016).

Frente a isso, os métodos eletroquímicos possuem vantagens como fácil operação, resposta rápida, alta sensibilidade e custo relativamente baixo. Desta forma, podemos encontrar na literatura alguns trabalhos dedicados à determinação de EU em diferentes amostras envolvendo as técnicas de pulso (PAUL *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2014).

Sağlam et al. relataram a determinação do EU em um fármaco utilizando como eletrodo de trabalho um lápis de grafite, sendo o limite de detecção de  $0,085 \mu\text{mol L}^{-1}$  obtido utilizando a DPV (SAĞLAM *et al.*, 2016). Tonello *et al.* desenvolveram um método voltamétrico para a determinação simultânea de EU, thymol (Ty) e carvacrol (CA) em mel por SWV utilizando o eletrodo de carbono vítreo e o limite de detecção calculado foi de  $0,010 \text{ mg L}^{-1}$  (TONELLO *et al.*, 2016).

Afzali et al. utilizaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro para a determinação do EU em água de rosa por DPV, sendo o limite de detecção obtido de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  (AFZALI *et al.*, 2014).

### 3.3.3. Chumbo

O Pb é considerado um elemento potencialmente tóxico, não essencial e possui ação nociva aos organismos vivos (LEE *et al.*, 2006; MEERAVALI e KUMAR, 1998). É amplamente utilizado em diversas áreas industriais, como automobilística (MAY *et al.*, 2018), indústria bélica (REIS *et al.*, 2004), na produção de tintas (OZBEK e AKMAN, 2016), cosméticos (NG *et al.*, 2015), entre outras.

Os cosméticos abrangem diversos produtos que são aplicados nas diversas partes externas do corpo humano como pele, cabelo, unhas, lábios entre outros. Alguns cosméticos como produtos para sistemas capilares apresentam em sua formulação o acetato de chumbo devido a sua capacidade de cobrir os cabelos grisalhos (KIRKLAND *et al.*, 2005), porém o Pb possui elevada toxicidade podendo ser introduzido no organismo através da inalação, ingestão e também por via cutânea biacumulando-se no organismo, causando assim riscos à saúde humana. Após a absorção, o Pb entra na corrente sanguínea depositando-se rapidamente sob a forma de trifosfatos no fígado, rins, cérebro, pulmão e ossos (LARINI, 1997; SCHVARTSMAN, 1985), sendo que a maior concentração desse metal é encontrada nos ossos, devido à habilidade de interação com as proteínas, inibindo assim o cálcio (LARINI, 1997; SCHVARTSMAN, 1985).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o limite máximo permitido de acetato de chumbo em tintas de cabelo é 0,6%, ou seja, 0,38% de Pb (ANVISA, 2013).

As determinações quantitativas de Pb em diferentes matrizes são empregadas por técnicas espectrométricas (CHAHID *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017; NG *et al.*, 2015; YEDOMON *et al.*, 2017; BAKIRCIOGLU *et al.*, 2011; RUBIO *et al.*, 2018) e voltamétricas (AL-HOSSAINY *et al.*, 2017; GECA e KOROLCZUK, 2017; LI *et al.*, 2016; VICENTINI *et al.*, 2014.).

Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos dedicados à determinação de Pb utilizando diferentes eletrodos, tais como Hg (ALMEIDA *et al.*, 2016), GCE modificado com filme de bismuto combinado a nanopartículas de ouro-grafeno-cisteína (Au-GN-Cys) (ZHU *et al.*, 2014), GCE modificado com filme de bismuto combinado com Nafion (TESFAW *et al.*, 2018), filme de bismuto contendo nanotubos de carbono combinado com poly(PVC) (polímero) (CHAMJANGALI *et al.*, 2015) e eletrodo de pasta de carbono modificado com zeolitas (KAWDE *et al.*, 2017).

Considerando que o mercado mundial da beleza movimenta bilhões de dólares por ano e a todo o momento são introduzidos novos produtos no mercado é extremamente pertinente o desenvolvimento de métodos de análise que sejam rápidos e eficientes para a determinação de Pb a fim de garantir qualidade e segurança aos produtos oferecidos à população. Essa necessidade vem de encontro ao desenvolvimento de novos eletrodos que apresentem alta versatilidade, baixo custo e facilidade na preparação, proporcionando análises rápidas, com menores limites de quantificação sem perder a confiabilidade nos resultados.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

Nesta tese foram desenvolvidos três eletrodos de trabalho: o primeiro foi aplicado para a determinação de HQ em cremes dermatológicos; o segundo eletrodo proposto foi aplicado na determinação de EU em óleos de cravo e o terceiro foi utilizado para a determinação de Pb em tinturas capilares.

No presente capítulo será feita a descrição dos equipamentos, reagentes, soluções, preparo das amostras e as condições avaliadas para a otimização dos parâmetros experimentais e voltamétricos na determinação de HQ, EU e Pb. Em seguida, serão descritos os procedimentos analíticos e os principais parâmetros avaliados empregando a VIM, incluindo os procedimentos de preparação dos eletrodos de trabalho. Por fim, serão descritos os procedimentos utilizados para fins de comparação com os métodos propostos para a determinação de HQ, EU e Pb nas amostras, bem como a caracterização voltamétrica e morfológica dos eletrodos propostos.

### 4.1. Instrumentação

As análises voltamétricas para a determinação de HQ e EU foram feitas utilizando um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT204 (Autolab, Holanda), controlado pelo software Nova 2.0 (Eco Chemie). Para as medidas voltamétricas de Pb foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato (Autolab, Holanda) PGSTAT 302N com Interface IME 663 VA (Autolab, Holanda) e Stand VA 663 (Metrohm, Suíça) gerenciado com software Nova 2.1. Os dados de todas as análises foram tratados pelo programa Origin Pro 8.0.

Todos os ensaios voltamétricos foram feitos em uma célula eletroquímica composta por três eletrodos utilizando como eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) e um fio de platina como contra-eletrodo. No caso dos ensaios voltamétricos para a determinação de HQ e EU foram utilizados os eletrodos de hidroquinona imobilizada no filme de quitosana reticulada contendo *carbon black* sobre a superfície

do eletrodo de carbono vítreo ( $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE) e de eugenol imobilizado sobre a superfície do carbono vítreo contendo o filme de dihexadecil hidrogenofosfato a base de *carbon black* ( $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE), respectivamente. Para o Pb foi utilizado o eletrodo de chumbo imobilizado sobre a superfície da pasta de carbono ( $Pb_{(imob.)}$ /CPE).

Antes da modificação da superfície, os eletrodos de carbono vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*) ( $\varnothing = 3$  mm) foram polidos sobre a superfície de um pano de polimento (Risitec, Brasil) com auxílio de uma politriz Metalográfica Plr-II (Risitec, Brasil) para a obtenção de uma superfície espelhada e limpa.

Foi utilizado um pHmetro digital pH21 (Hanna, Brasil) conectado a um eletrodo de vidro combinado (com resolução de 0,01 unidades de pH) com um eletrodo de referência interno Ag/AgCl ( $KCl$  3,0 mol L<sup>-1</sup>).

Para a preparação das dispersões e homogeneização das soluções foi utilizado um banho ultrassônico Ultraclen 1400 A (UNIQUE, Brasil).

As balanças analíticas AUW220D (Shimadzu, Japão) com resolução de  $\pm 0,01$  mg, H10 (Mettler, EUA) com precisão  $\pm 0,1$  mg e Marte (Marte Científica, Brasil) com precisão  $\pm 1$  mg foram utilizadas para os procedimentos de pesagem.

Para a pipetagem das soluções foram utilizados micropipetadores automáticos com capacidade variável de 0,1 a 10  $\mu$ L, 10 a 100  $\mu$ L e 100 a 1000  $\mu$ L (Brand, Alemanha).

Para o preparo de soluções e lavagem das vidrarias foi utilizada água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Direct-Q UV3® (Millipore, Alemanha), com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm.

Para a decomposição das amostras de tinturas capilares foi utilizado um forno de micro-ondas Multiwave 3000® (Anton Paar, Áustria) equipado com 8 frascos de quartzo com volume interno máximo de 80 mL, com condições máximas de temperatura, pressão e potência de 280°C, 80 bar e 1400 W, respectivamente.

As análises espectrométricas foram realizadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua, ContrAA 700 (Analytik Jena, Alemanha) operado com tubos de grafite revestidos com grafite pirolítico, com sistema de plataforma integrada e como fonte de radiação, foi utilizada uma lâmpada de arco

curto de xenônio (Analytik Jena, Alemanha). Para a determinação de Pb, foi monitorada a linha de ressonância secundária em 217 nm.

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando um Espectrofotômetro UV-2550 (Shimadzu, Japão) com célula de quartzo de 1,0 cm. Para as análises morfológicas dos materiais foi utilizado Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JSM 6610 LV (JEOL, Japão), operando a 20 kV.

Foi aplicado o teste *t-student* (comparação entre duas médias) para o tratamento dos dados referentes à otimização dos parâmetros experimentais e eletroanalíticos das técnicas voltamétricas. A comparação entre três ou mais médias foi feita através da análise de variância (ANOVA) utilizando o teste *de Tukey-Kramer* com auxílio do programa InStat, versão 3.0 (Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc., Microsoft Corporation). Para comparação entre as técnicas analíticas foi feito o teste-*t* pareado. Todas as avaliações foram feitas em um nível de confiança de 95%.

#### 4.2. Reagentes e soluções

Os padrões de HQ, ECH quitosana (CTS), com massa molar baixa e grau de desacetilação 80%, glutaraldeído (GA) 25% (m/v), EU e DHP foram adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA). O NaOH e  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  foram adquiridos da Merck (Alemanha) e os reagentes  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  e KCl foram adquiridos na Acros (Brasil), o  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial,  $\text{HNO}_3$  65% e  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pela Synth (Brasil). A solução padrão de Pb ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  foram adquiridos da SpecSol (Brasil). O CB (VXC72R) foi gentilmente fornecido pela *Cabot Corporation* e o pó de grafite foi adquirido da Fisher Chemical (EUA). Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

A solução padrão de HQ ( $0,73 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi preparada diariamente pela dissolução de 0,002 g de HQ em 25 mL de água ultrapura à temperatura ambiente ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A solução de CTS (1,0% m/v) foi preparada dissolvendo-se 1,0 g de pó de CTS em 100 mL de solução de ácido acético 1,0% (v/v) à temperatura ambiente, mantendo-se a solução sob agitação constante durante 3 h até a dissolução completa.

A solução de ECH 1,0% (v/v) foi obtida a partir da diluição de 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão 99% (v/v) em 10 mL de solução de NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

As soluções de CTS e ECH foram armazenadas sob refrigeração (4 °C).

A solução de EU (65 mmol L<sup>-1</sup>) foi preparada diariamente em uma proporção (1:1) de água ultrapura e etanol à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e a solução de Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> foi preparada semanalmente pela dissolução de 1 mg deste sal em 1 mL de água ultrapura à temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

Soluções de tampão fosfato (0,1, 0,2 e 0,4 mol L<sup>-1</sup>) com pH variando de 2,0 a 8,0 foram preparadas a partir da diluição do volume adequado de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>conc. e dissolução das respectivas massas de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. As soluções de tampão acetato (0,1 e 0,2 mol L<sup>-1</sup>) pH 5 foram preparadas pela diluição de um volume adequado de CH<sub>3</sub>COOH glacial e dissolução da respectiva massa de CH<sub>3</sub>COONa. Solução de tampão Britton-Robinson (BR) com pH 2,0 foi preparada a partir da dissolução de 0,010 g de NaOH, 0,059 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> em 0,218 mL de CH<sub>3</sub>COOH e 0,222 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (aferição com água ultrapura à 100 mL).

A vidraria e outros materiais comuns de laboratório utilizados na análise de Pb foram descontaminados por imersão em uma solução de HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) (Synth, Brasil) durante 24 h e, posteriormente, lavados com água ultrapura. As células voltamétricas foram descontaminadas por imersão em uma solução de HNO<sub>3</sub> 20% (v/v) (Synth, Brasil) e antes de serem utilizadas foram lavadas com água ultrapura.

### **4.3. Preparo das amostras**

As amostras utilizadas na determinação de HQ e EU foram adquiridas no comércio local de São Carlos-SP. Para a determinação de Pb foram utilizadas amostras adquiridas no comércio local de Rio Grande-RS.

#### **4.3.1. Creme dermatológico**

Para a análise voltamétrica, 10 mg de amostra foram solubilizadas com 2,0 mL de água ultrapura e 100 µL desta solução foi adicionada a dispersão de CTS reticulada com ECH na presença de nanopartículas de CB.

Para a análise espectrofotométrica as amostras foram preparadas através da dissolução de 0,1 g de creme dermatológico em 10 mL de metanol. Após serem

abertas as amostras de pomadas ( $A_1$  e  $A_2$ ) foram armazenadas na ausência de luz a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

#### 4.3.2. Óleo de cravo

Para a análise voltamétrica, os óleos de cravo  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$  foram homogeneizadas por agitação manual e 100, 500 e 100  $\mu\text{L}$ , respectivamente foram diluídos com água ultrapura e etanol em proporção (1:1) até 10 mL. Posteriormente, 300  $\mu\text{L}$  das soluções de  $S_1$  e  $S_3$  foram adicionados a 1,0 mL de água ultrapura e 2,7  $\mu\text{L}$  (8,6  $\mu\text{g}$  de massa de amostra) foi imobilizada sob a superfície dos eletrodos. No caso da amostra  $S_2$ , foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da amostra diluída em 1,0 mL de água ultrapura e 2,7  $\mu\text{L}$  (72  $\mu\text{g}$  de massa de amostra) foi imobilizado sobre a superfície dos eletrodos.

Para a análise espectrofotométrica uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de amostra foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume aferido com solução hidroalcoólica (50% v/v). Em seguida 200  $\mu\text{L}$  da solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, sendo o volume aferido com água ultrapura e etanol em uma razão de (1:1 v/v). Após abertos os frascos, as amostras ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ) foram armazenadas na ausência de luz a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

#### 4.3.3. Tintura capilar

Para a análise voltamétrica, 1 mg de amostra de tintura capilar foi solubilizada com 1,0 mL de água ultrapura e 10  $\mu\text{L}$  desta solução foi adicionada sobre a superfície do eletrodo.

Para a análise por Absorção Atômica as amostras foram decompostas por via úmida empregando-se um forno de micro-ondas. Para tal, 300 mg de amostra foram introduzidas no frasco de quartzo, seguido da adição de 6 mL de  $\text{HNO}_3$  bidestilado concentrado. O programa de irradiação foi feito da seguinte forma: 15 minutos, para atingir 1400 W, permanecendo por 20 minutos nesta potência e 20 min a 0 W (etapa de resfriamento). Após a decomposição, as amostras foram aferidas a 30 mL com água

ultrapura. Após serem abertas as amostras de tintas de cabelo ( $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ ) foram armazenadas na ausência de luz a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

#### 4.4. Otimização dos parâmetros experimentais e voltamétricos

##### 4.4.1. Determinação de hidroquinona

Estudos preliminares utilizando a Voltametria Cíclica (CV) e a DPV foram feitos com o objetivo de obter informações da eletroatividade da HQ imobilizada (40 ng) no filme de CTS à base de um material condutor. Assim, avaliou-se a influência do tipo de material condutor (CB ou grafite em pó) e do agente de reticulação (2,5% (v/v) GA ou 1,0% (v/v) de ECH), bem como a estratégia seguida para a preparação do eletrodo (para a avaliação do agente reticulante utilizou-se 20 ng de HQ).

Foram avaliados dois procedimentos de reticulação da CTS com ECH (na presença de 50 ng de HQ). 1° procedimento: 200  $\mu$ L de ECH foram adicionadas na dispersão CB-CTS (1,3 mg de CB e 1,0 mL CTS 1% m/v dispersas com agitação ultrassônica por 30 min) e sonicados por 8 min em ultrassom (a reação de reticulação da CTS ocorreu antes da imobilização no substrato GCE). Posteriormente, foi transferido (imobilizado) 8  $\mu$ L da dispersão obtida para a superfície do GCE e subsequente evaporação do solvente (2 h a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C)). 2° procedimento: 1,2  $\mu$ L de ECH (1% v/v) foi adicionada (imobilizada) sobre a superfície do GCE contendo 6,8  $\mu$ L da dispersão de CB-CTS e HQ (1,3 mg de CB e 1,0 mL CTS 1% m/v dispersas com agitação ultrassônica por 30 min) de maneira que a reticulação da CTS ocorre diretamente na superfície do eletrodo. O solvente foi evaporado durante 2 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

Após a otimização da composição do eletrodo e do melhor modo de preparação, foi avaliada a influência do eletrólito suporte e sua concentração, bem como o pH do meio. Em relação à composição química, foram testados KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), tampão acetato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,0) e tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em pH 5,0. A influência da concentração do eletrólito suporte selecionado foi estudada em 0,1, 0,2 e  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0). O estudo do pH foi feito utilizando os parâmetros previamente otimizados e o

efeito do pH na resposta eletroquímica da HQ imobilizada foi investigado pela variação entre pH 4,0 e 10,0, com intervalos de 1 unidade de pH.

O efeito dos parâmetros instrumentais (velocidade de varredura de potencial de 2,5 a 10  $\text{mV s}^{-1}$ , amplitude de 10 a 100 mV e tempo de modulação de 10 a 40 ms) da DPV sobre a resposta de corrente do pico de oxidação da HQ imobilizada (40 ng) sobre a superfície do eletrodo  $\text{HQ}_{(\text{imob.})}\text{-CB-CTS-ECH/GCE}$  foram avaliados e otimizados.

#### 4.4.2. Determinação de eugenol

Inicialmente, foi avaliado por CV o efeito dos filmes de DHP (a) e CTS reticulada com ECH (b) na imobilização do EU. (a) Filme de DHP: a dispersão obtida sob agitação ultrassônica (30 min) foi preparada através da mistura de 1,0 mg de CB e 1,0 mg de DHP em 1,0 mL de água ultrapura. Após, 5,3  $\mu\text{L}$  da dispersão foi transferida para a superfície do GCE e 2,7  $\mu\text{L}$  da solução padrão de EU (ou amostra) foram cuidadosamente colocados sobre o material disperso imobilizado no eletrodo e em seguida o solvente foi então evaporado à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) durante 2 h. Obtendo-se assim, o eletrodo de  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$ ; (b) Filme de CTS reticulada com ECH: a dispersão foi preparada sob agitação ultrassônica (30 min) pela mistura de 1,3 mg de CB em 1,0 mL de solução de CTS (1,0% m/v). Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do padrão de EU ( $65 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 200  $\mu\text{L}$  da solução de ECH 1,0% (v/v), e esta dispersão foi sonicada novamente por 8 min. Uma alíquota de 8  $\mu\text{L}$  da dispersão obtida foi transferida para a superfície GCE e por seguinte, o solvente foi evaporado durante 2 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Para ambos os filmes, a massa imobilizada do padrão de EU foi 29  $\mu\text{g}$  e os voltamogramas cíclicos foram registrados em solução tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

O efeito do pH na resposta eletroquímica do EU imobilizado (29  $\mu\text{g}$ ) foi investigado pela variação entre pH 2,0 e 9,0, com intervalos de 1 unidade de pH, utilizando tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Em relação à composição química, foram testados tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ), e tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) ambos em pH 2,0. O estudo da concentração do eletrólito suporte foi feito utilizando os parâmetros previamente otimizados e a influência da concentração do tampão fosfato foi estudada em 0,1, 0,2 e  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0).

O efeito dos parâmetros instrumentais da SWV, sobre o sinal analítico do EU imobilizado (29 µg), avaliados foram amplitude (de 10 a 170 mV), frequência (de 10 a 45 Hz) e  $E_{\text{step}}$  (de 1 a 9 mV).

#### 4.4.3. Determinação de Chumbo

Inicialmente foram avaliados o efeito da composição e o modo de preparação da pasta, contendo proporções fixas de aglutinante 20% (m/m) e condutor 80% (m/m), em relação à resposta voltamétrica de Pb imobilizado. Cabe salientar que para estes estudos foram imobilizados 6,4 µg de padrão de Pb na superfície da pasta e cada parâmetro estudado foi avaliado em triplicata (n=3).

Quanto à seleção do aglutinante foram feitos estudos utilizando parafina e óleo mineral. Inicialmente, homogeneizou-se o condutor com o aglutinante com o auxílio de um gral e pistilo por aproximadamente 40 min, à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Em seguida, a pasta obtida foi empacotada em uma seringa de injeção de insulina com 90 mm de altura e diâmetro 2,6 m, utilizando como contato elétrico um fio de cobre. Após, um volume de 20 µL de água ultrapura foi adicionado na superfície da pasta e cuidadosamente foram adicionados 10 µL da solução do padrão de acetato de chumbo ( $3,07 \text{ nmol L}^{-1}$ ) sobre superfície do eletrodo, sendo a evaporação do solvente feita à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) em um dessecador por 12 h.

Após a seleção do melhor aglutinante, foram realizados experimentos para a obtenção do melhor procedimento de preparação da pasta. Neste estudo dois procedimentos foram avaliados. Procedimento 1: consiste no aquecimento prévio do gral e do pistilo (à 100 °C, por aproximadamente, 1 h na estufa) e adição de parafina e CB que permaneceram sob maceração por 40 min à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). No procedimento 2: o gral e o pistilo foram aquecidos previamente (à 100 °C por 1 h na estufa) antes da adição da parafina e do CB e mantido sob aquecimento constante (sobre uma chapa de aquecimento, aproximadamente 100 °C) durante todo o processo de maceração (40 minutos). Por fim, as pastas foram empacotadas.

Após a seleção do melhor modo de preparação da pasta, a comparação entre o pó de grafite e o CB foi feita com o objetivo de avaliar a influência dos condutores na

composição da pasta, levando em consideração os parâmetros previamente otimizados.

Depois da otimização da composição e da melhor forma de preparação da pasta, foi avaliado o método de imobilização do Pb na superfície do eletrodo, por meio de dois procedimentos com a presença e ausência do filme de DHP. O filme de DHP foi preparado pela mistura de 1,0 mg de CB e 1,0 mg de DHP em 1,0 mL de água ultrapura, sendo esta dispersão colocada sob agitação ultrassônica durante 30 min. Para a imobilização do filme na superfície da pasta de carbono, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 10  $\mu\text{L}$  da dispersão obtida e 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão de acetato de chumbo (6,4  $\mu\text{g}$  de Pb), sendo a evaporação do solvente feita à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) em um dessecador por 12 h. Na ausência do filme de DHP, foi feito o mesmo procedimento descrito acima, porém ao invés de adicionar a dispersão de DHP foi adicionado água ultrapura.

Com objetivo de verificar o comportamento do Pb em outra superfície a base de carbono foi feita a imobilização do padrão de Pb na superfície do GCE. Para tal, 10  $\mu\text{L}$  do padrão de acetato de chumbo (6,4  $\mu\text{g}$  de Pb) foi adicionado sobre a superfície do substrato. Após esperou-se a evaporação do solvente (temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) em um dessecador por 12 h).

Após a seleção do eletrodo a influência do pH foi avaliada em um intervalo entre 3 e 8, em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Para avaliar o efeito do eletrólito suporte na resposta voltamétrica do eletrodo Pb<sub>(imob.)</sub>/ CPE contendo 6,4  $\mu\text{g}$  de Pb imobilizado na superfície, foram utilizadas as soluções de tampão acetato e tampão fosfato ambas com 0,2 mol L<sup>-1</sup> e pH 5, nas condições anteriormente otimizadas. Após, foi avaliada a influência da concentração do tampão fosfato (0,1, 0,2 e 0,4 mol L<sup>-1</sup>) em pH 5,0.

O efeito dos parâmetros instrumentais da DPV, sobre a resposta de  $I_{pa}$  do Pb imobilizado (6,4  $\mu\text{g}$ ), foram avaliados variando a velocidade de varredura de potencial de 2,5 a 10 mV s<sup>-1</sup>, amplitude de 25 a 100 mV e tempo de modulação de 10 a 50 ms.

#### **4.5. Desenvolvimento dos eletrodos de trabalho e métodos voltamétricos para determinação dos analitos de interesse**

A limpeza das superfícies dos eletrodos é de extrema importância e deve ser feita antes e após a utilização dos eletrodos, a fim de garantir resultados confiáveis para as próximas imobilizações. As superfícies dos GCEs foram cuidadosamente polidas sobre a superfície de um pano de polimento com auxílio de uma politriz e lavadas com água ultrapura. Após os eletrodos foram submetidos à sonicação, inicialmente em álcool isopropílico e após em água ultrapura, por 2 min. Posteriormente foram secos a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Já a renovação da superfície dos CPE empacotados foi feita através de um polimento manual sobre a superfície de um papel sulfite.

As curvas de calibração foram avaliadas neste trabalho através do método de regressão linear, onde foi possível estimar os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) via calibração externa (cada ponto da curva corresponde a uma massa imobilizada em um eletrodo diferente). As curvas analíticas foram avaliadas em triplicata, ou seja, em três dias diferentes e cada ponto da curva também analisado em triplicata. Para os estudos dedicados a HQ e EU foram utilizados 12 eletrodos de GCE. E para o Pb foram utilizados 12 eletrodos de pasta de carbono.

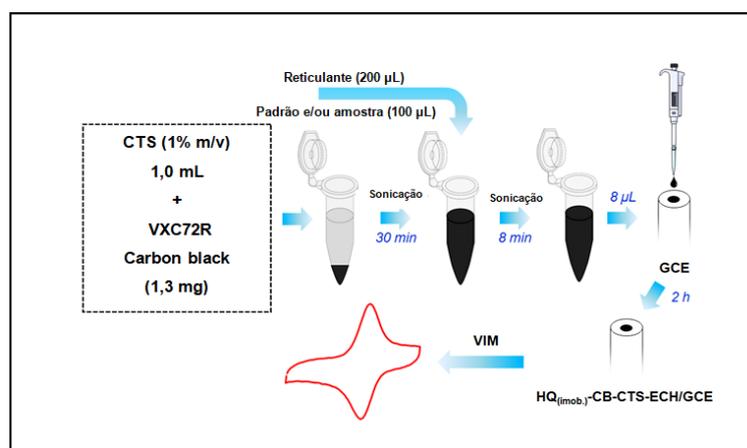
Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados usando as relações  $3 \times (\sigma_b / m)$  e  $10 \times (\sigma_b / m)$ , respectivamente, onde  $\sigma_b$  é o desvio padrão obtido para dez medidas do branco e  $m$  é a sensibilidade analítica.

Além disso, foram avaliados o estudo de possíveis interferentes, a estabilidade e repetibilidade dos eletrodos modificados, bem como o comportamento eletroquímico do composto ou analito imobilizado nos eletrodos.

#### 4.5.1. Preparação do $\text{HQ}_{(\text{imob.})}\text{-CB-CTS-ECH/GCE}$ e determinação de HQ em creme dermatológico por VIM – Parte 1

A Figura 3 mostra um esquema das etapas seguidas para a obtenção do eletrodo modificado.

**Figura 3.** Esquema de preparação do  $\text{HQ}_{(\text{imob.})}\text{-CB-CTS-ECH/GCE}$ .



Para a preparação do eletrodo  $\text{HQ}_{(\text{imob.})}\text{-CB-CTS-ECH/GCE}$ , uma dispersão com 1,3 mg de CB e 1,0 mL de CTS (1% m/v) foi preparada sob agitação ultrassônica (30 min). Após, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do padrão de HQ e/ou amostra (preparações da solução padrão e da amostra estão descritas nas seções 3.2 e 3.3.1, respectivamente) e 200  $\mu\text{L}$  da solução de ECH (1% v/v), sendo esta dispersão novamente sonicada por 8 min. Posteriormente, com auxílio de uma micropipeta foram adicionados 8  $\mu\text{L}$  da dispersão obtida sobre a superfície do GCE e subsequente evaporação do solvente por 2 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

Para a determinação de HQ as medidas CV e DPV foram realizadas em solução tampão fosfato 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 5,0). As condições experimentais para DPV foram:  $E_i = -0,1$  V,  $E_f = 0,35$  V, amplitude = 80 mV, tempo de modulação = 35 ms e velocidade de varredura = 5  $\text{mV s}^{-1}$ . As medidas por CV foram realizadas em uma faixa de potencial de -0,1 V a +0,35 V, a uma velocidade de varredura de 50  $\text{mV s}^{-1}$ .

A curva analítica foi preparada a partir da imobilização de 2,7; 5,4; 11; 16; 21,5; 27; 32; 38 e 43 ng de HQ sobre as superfícies dos GCEs.

O estudo da repetibilidade do eletrodo modificado foi feito a partir da imobilização de dois níveis de massa de HQ (17 ng e 33 ng). Neste estudo, três eletrodos para cada massa foram preparados e as análises foram realizadas em triplicata.

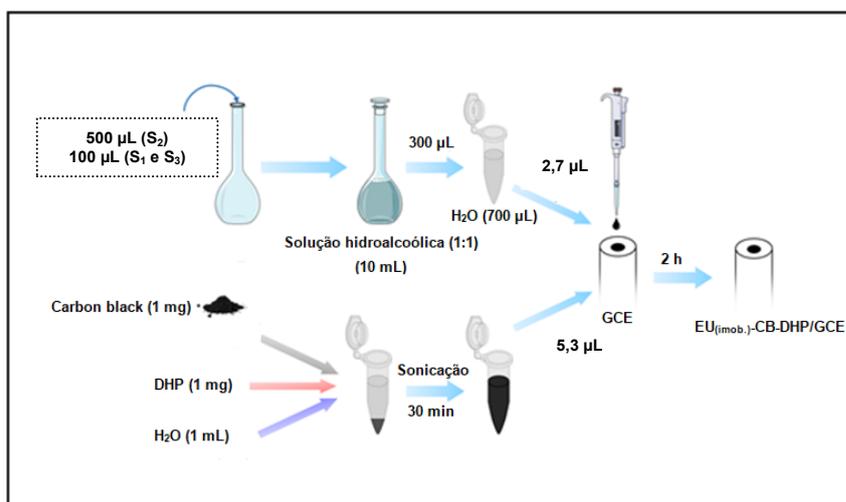
A estabilidade da resposta do eletrodo modificado contendo 22 ng de HQ imobilizada foi avaliada por meio de 30 sucessivas medidas usando a DPV.

Os possíveis efeitos de interferência da fluocinolona acetonide e da tretinoína (compostos majoritários presentes em cremes dermatológicos) foram investigados pela imobilização desses compostos na presença de HQ, nas razões em massa de 400:1 para fluocinolona acetonide:HQ e 80:1 para tretinoína:HQ.

#### 4.5.2. Preparação do $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE e determinação de EU em óleos de cravo por VIM – Parte 2

O procedimento de preparação do  $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE é mostrado na Figura 4.

**Figura 4.** Esquema de preparação do  $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE.



Para tal, uma dispersão com 1,0 mg de CB e 1,0 mg de DHP em 1,0 mL de água ultrapura foi preparada sob agitação ultrassônica (30 min). Após, um volume de 5,3 µL da dispersão foi transferido para a superfície do GCE e 2,7 µL da solução padrão de

EU ou amostra (preparação das soluções do padrão descrita na seção 4.2 e da amostra descrita na seção 4.3) foram cuidadosamente colocados na superfície do eletrodo, e o solvente foi então deixado evaporar à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) por 2 h.

Para a determinação de EU as medidas CV e SWV foram realizadas em solução tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0). As condições experimentais utilizadas para as análises por SWV foram:  $E_{\text{inicial}} = 0,25 \text{ V}$ ,  $E_{\text{final}} = 0,9 \text{ V}$ , amplitude: 90 mV, frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ . As medidas por CV foram realizadas no intervalo de  $E_i = -0,4 \text{ V}$  e  $E_f = +0,8 \text{ V}$ , a uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A curva analítica foi preparada a partir da imobilização de 0,03; 0,14; 0,29; 0,86; 1,4; 2,9; 4,6; 6,9; 9,2; 11; 14; 17; 20; 23; e 26  $\mu\text{g}$  de EU sobre as superfícies dos GCEs.

Para a avaliação da repetibilidade, sete eletrodos foram preparados simultaneamente através da imobilização de 20  $\mu\text{g}$  de EU e as análises por SWV foram realizadas em triplicata.

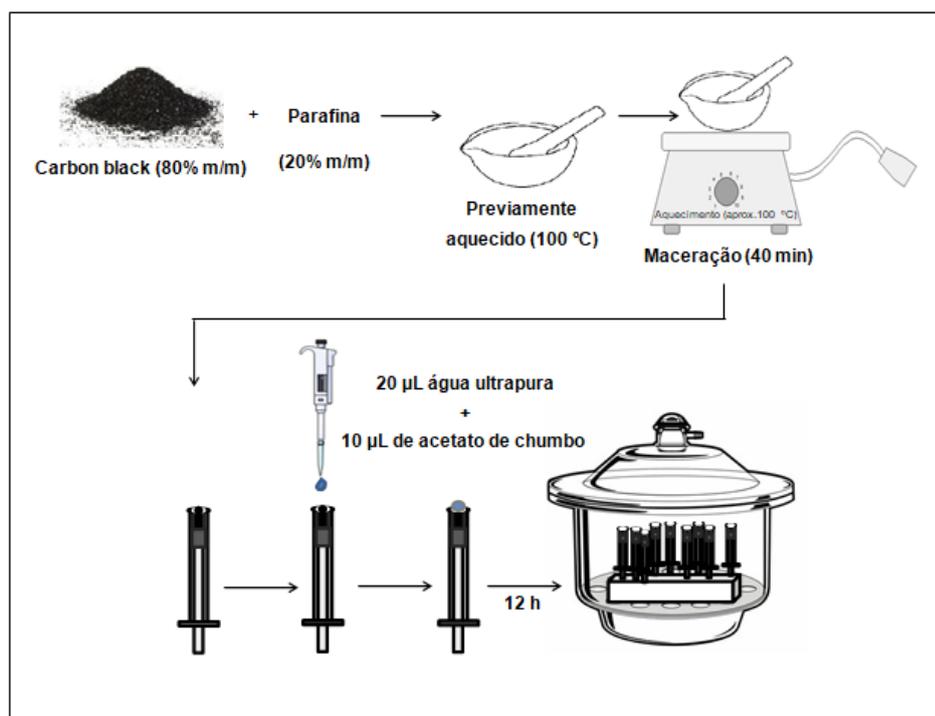
Na avaliação da estabilidade do sinal do eletrodo, a resposta do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 6,9  $\mu\text{g}$  de EU imobilizado foi monitorada durante 30 sucessivas medidas usando a SWV.

Para investigar a seletividade do eletrodo  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  foi imobilizado 6,9  $\mu\text{g}$  de EU e a mesma massa de propilenoglicol na superfície do eletrodo. O propilenoglicol foi selecionado para este estudo, pois é um dos principais componentes presentes nos óleos de cravo analisados neste trabalho.

### 4.5.3. Preparação do $Pb_{(imob.)}/CPE$ e determinação de Pb em tinturas capilares por VIM – Parte 3

O procedimento da preparação da pasta de carbono e imobilização de Pb no eletrodo está mostrado na Figura 5.

**Figura 5.** Esquema de preparação do  $Pb_{(imob.)}/CPE$ .



A pasta foi preparada pela maceração de 0,8 g de CB e 0,2 g de parafina em gral e pistilo (sob aquecimento a 100 °C) por 40 min. Em seguida, a mistura obtida foi empacotada em uma seringa de injeção de insulina (90 mm de altura e diâmetro 2,6 mm) utilizando como contato elétrico um fio de cobre. Após, 20 µL de água ultrapura foi adicionado na superfície da pasta, seguidos de 10 µL da solução padrão de acetato de chumbo e/ou amostra. A evaporação do solvente foi feita à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) em um dessecador por 12 h.

Para a determinação de Pb, as medidas CV e DPV foram realizadas em solução tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0). As condições experimentais utilizadas por DPV foram:  $E_{inicial} = -1,2 \text{ V}$ ,  $E_{final} = -0,4 \text{ V}$ , amplitude = 70 mV, tempo de modulação = 0,02 s

e velocidade de varredura de potencial =  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . As análises por CV foram realizadas em um intervalo de potencial entre  $-1,0 \text{ V}$  e  $-0,2 \text{ V}$ , a uma velocidade de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A curva de calibração externa foi obtida pela imobilização de 0,042; 0,16; 0,64; 1,3; 1,9; 2,5 e 3,2  $\mu\text{g}$  de Pb sobre as superfícies dos eletrodos de pasta de carbono.

O estudo da repetibilidade intra-dia foi feito a partir da imobilização de 1,3  $\mu\text{g}$  de Pb sobre a superfície de 5 eletrodos e as análises foram realizadas em triplicata. O estudo da repetibilidade inter-dia foi feito a partir da imobilização de 2,5  $\mu\text{g}$  de Pb na superfície de um eletrodo de pasta de carbono e os valores de corrente de pico anódico foram monitorados, no mesmo eletrodo e mesma superfície, entre 2 dias.

A estabilidade de resposta do  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  foi avaliada de 2 maneiras, sendo a primeira avaliação feita através de 50 ciclos a uma velocidade de varredura constante de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e a segunda através de 30 sucessivas medições feitas por DPV sob as condições otimizadas anteriormente. Neste estudo foi imobilizado 2,5  $\mu\text{g}$  de Pb sobre a superfície do  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$ .

A possível interferência de cloreto de amônio e o propilenoglicol (compostos presentes em todas as amostras de tinturas capilares analisadas neste trabalho e indicadas pelo fabricante) foram investigadas neste estudo. Para avaliar o efeito destes compostos, uma massa de 3,2  $\mu\text{g}$  de Pb foi imobilizada e sua resposta voltamétrica foi analisada na ausência e na presença de 3,2  $\mu\text{g}$  de cada possível interferente.

#### **4.6. Métodos comparativos para as determinações de HQ em cremes dermatológico, EU em óleos de cravo e Pb em tinturas capilares**

Para a determinação de HQ e EU foi utilizado o método comparativo por Espectrofotometria de Absorção Molecular (UV-vis).

O procedimento descrito por USP (2012) foi utilizado para a determinação de HQ (USP, 2012). Foram preparadas curvas de calibração externa em metanol nas concentrações de 1; 2; 3; 4; 5 e 6  $\text{mg L}^{-1}$  de HQ e a absorbância foi monitorada em 293 nm.

Para a determinação do EU o procedimento utilizado foi descrito por Pramod *et al* (com algumas adaptações) (PRAMOD *et al.*, 2013). Para a obtenção da curva de

calibração externa, foram preparadas as soluções padrão de EU concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30 e 40 mg L<sup>-1</sup> em solução hidroalcoólica (água ultrapura e etanol, em proporção (1:1 v/v). O espectro de absorção do EU foi monitorado em 282 nm.

Como método comparativo para a determinação de Pb em tinturas capilares foi utilizado a Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua com forno de grafite. Os parâmetros avaliados foram à temperatura de pirólise (600 a 1500 °C) e de atomização (1600 a 2400 °C). Essas análises foram feitas utilizando uma solução padrão de Pb (50 µg L<sup>-1</sup>) com a adição de 5 µL de uma solução de 1000 mg L<sup>-1</sup> do modificador químico Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Foram utilizados tubos de grafite revestidos com grafite pirolítico, com sistema de plataforma integrada, utilizando argônio como gás de purga com fluxo de 2,0 L min<sup>-1</sup>.

Para a obtenção da curva de calibração, foram preparadas diariamente e analisadas as soluções padrão de Pb com gradiente de concentração por padronização externa (concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100 µg L<sup>-1</sup>). Para as análises foram pipetados 20 µL de amostra e/ou padrão e 5 µL do modificador Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1000 mg L<sup>-1</sup>). Os programas de temperatura avaliados para a determinação de Pb, estão mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Programa de temperatura para a determinação de Pb por HR-CS GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tempo (s)	Ar (L min <sup>-1</sup> )
Secagem 1	90	3	20	2,0
Secagem 2	110	5	20	2,0
Pirólise	600-1500	300	15	2,0
Auto-zero	600-1500	0	5	0
Atomização	1600-2400	1500	4	0
Limpeza	2450	500	4	2,0

É importante salientar que o comportamento térmico foi investigado tanto na amostra quanto para a solução de referência, a fim de selecionar as temperaturas de pirólise e atomização mais adequadas. Neste trabalho, as curvas de pirólise e atomização foram avaliadas na amostra T<sub>1</sub> e na solução de padrão (50 µg L<sup>-1</sup> de Pb). O

Pb foi monitorado na linha de ressonância secundária (217 nm) devido à alta concentração presente na amostra T<sub>1</sub>.

#### **4.7. Caracterização voltamétrica e morfológica dos eletrodos**

A caracterização voltamétrica no que se refere à cinética reacional foi realizada através da avaliação da resposta eletroquímica dos eletrodos modificados por CV variando a velocidade de varredura. As análises para HQ, EU e Pb foram feitas variando as velocidades de varredura de 10 a 200 mV s<sup>-1</sup>, 10 a 600 mV s<sup>-1</sup> e 50 a 700 mV s<sup>-1</sup>, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em uma célula contendo 15 mL de eletrólito suporte. As análises de HQ e Pb foram feitas com tampão fosfato (0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 5), em uma faixa de potenciais de -0,1 V a +0,35 V e -1,0 V a -0,2 V, respectivamente. Para a análise do EU foi utilizado o tampão fosfato (0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 2) em uma faixa de 0 V a +1,0 V.

A caracterização morfológica foi realizada por MEV, onde as amostras foram fixadas em um stub utilizando uma fita adesiva dupla face e em seguida essas foram recobertas com ouro. Para isto foi utilizado um equipamento da Dentun Vacuum, no qual as amostras ficaram expostas durante 120 s a uma corrente de 50 mA. Essa análise foi realizada no Centro de Microscopia da Zona-Sul (CEME-Sul), da FURG.

## 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

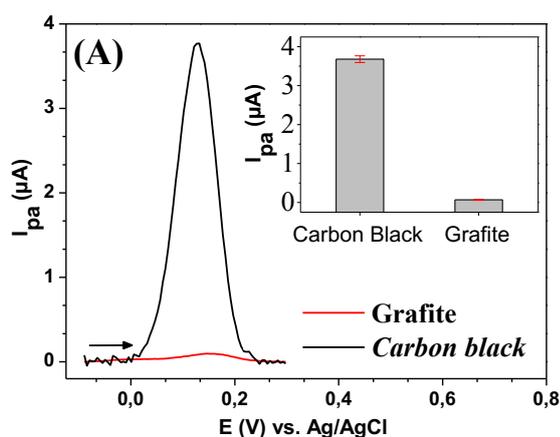
### 5.1. PARTE 1 – Determinação de Hidroquinona

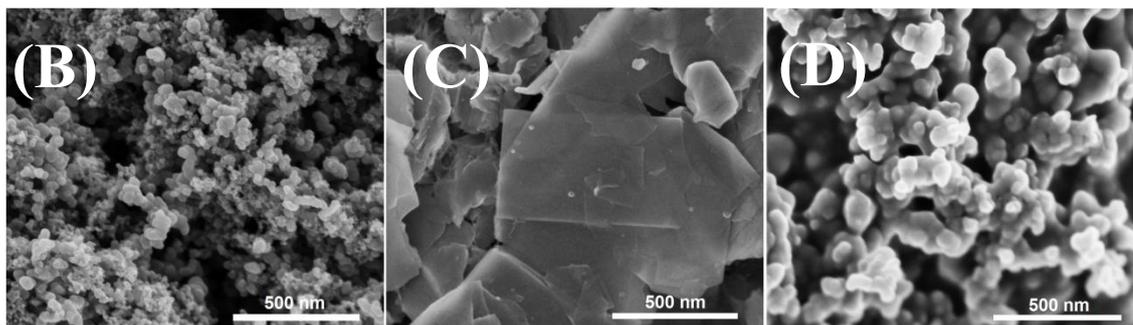
#### 5.1.1. Otimização das condições experimentais

##### 5.1.1.1. Seleção do filme

Os materiais à base de carbono, tais como, o pó de grafite e o CB foram avaliados como condutores e em ambos os casos, os filmes de CTS reticulada foram preparados contendo 40 ng de HQ imobilizada (preparação descrita detalhadamente seção 4.4.1). Na Figura 6 (A) são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos usando os GCEs modificados com filmes de CTS contendo CB e pó de grafite.

**Figura 6.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os filmes de CTS reticulada contendo CB (-) e pó de grafite (-) na presença de 40 ng de padrão de HQ imobilizada (condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5), E<sub>inicial</sub>: -0,1 V; E<sub>final</sub>: +0,35 V; amplitude: 25 mV; t<sub>m</sub>: 50 ms e v: 5 mV s<sup>-1</sup>. *Inset*: Gráfico da I<sub>pa</sub> vs. material de carbono) e microfotografias obtidas para (B) CB, (C) grafite e (D) filme de CTS reticulada contendo nanopartículas de CB.





Como pode ser observado na Figura 6 (A), o filme de CTS reticulada contendo CB apresentou um aumento significativo no sinal analítico da HQ. Comparativamente, a corrente de pico anódico obtida usando o eletrodo modificado com CB ( $3,68 \pm 0,08 \mu\text{A}$ ) foi aproximadamente 47 vezes maior do que a obtida usando o eletrodo modificado com pó de grafite ( $0,08 \pm 0,002 \mu\text{A}$ ). Assim, o CB foi selecionado como material condutor sendo incorporado ao filme de CTS para os próximos estudos. A melhor performance do CB pode ser associada à maior área superficial, derivada da alta porosidade em escala nanométrica das partículas quando comparado com o pó de grafite, podendo ser observado nas micrografias eletrônicas de varredura apresentadas na Figura 6 (B) e (C). Na Figura 6 (D) uma boa homogeneidade é observada para o filme de CTS reticulada na presença de nanopartículas de CB, favorecendo assim o processo redox da HQ imobilizada no filme proposto.

Após a seleção do melhor condutor, o efeito do agente de reticulação (GA e ECH) foi avaliado pela imobilização de 20 ng de padrão de HQ (procedimento 1 descrito na seção 4.4.1). Alguns estudos relatam que o agente de reticulação pode interferir na resposta do sensor (JANEGITZ *et al.*, 2011; JANEGITZ *et al.*, 2009), devido a ação dos grupos de reticulação no polímero, pois quando é utilizado o GA, a reticulação ocorre nos grupos amino disponíveis na CTS (BERGER *et al.*, 2004), enquanto que com ECH a reticulação ocorre preferencialmente nas hidroxilas da CTS (MERRIFIELD *et al.*, 2004). A partir dos valores de corrente de pico obtidos (resultados não mostrados aqui) para a oxidação da molécula de HQ nos diferentes agentes de reticulação, pode-se concluir que a ECH proporcionou uma resposta analítica ( $1,75 \pm 0,13 \mu\text{A}$ ) 65 vezes superior ao valor de corrente obtida utilizando o filme de CTS reticulada com GA ( $0,027 \pm 0,0006 \mu\text{A}$ ). Levando-se em consideração a maior

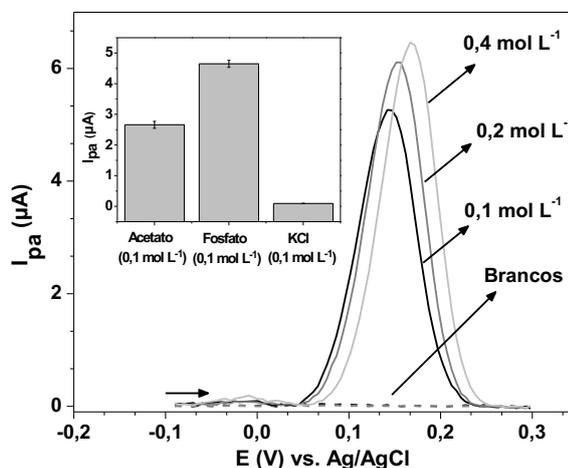
intensidade do pico, a CPE foi selecionada como agente de reticulação para estudos futuros.

O procedimento de reticulação da CTS na preparação do eletrodo modificado também foi estudado. Para isso, dois procedimentos foram testados. Em ambos os casos, 50 ng de HQ foi imobilizada. No procedimento (1), a adição da ECH ocorre durante a dispersão do condutor/CTS e no procedimento (2) a adição é feita sobre o material disperso imobilizado na superfície do eletrodo. O eletrodo modificado utilizando o procedimento (1) apresentou um sinal analítico 3 vezes maior (resultados não mostrados) do que o registrado usando o procedimento (2). Além disso, comparando o sinal de três eletrodos modificados, os valores do RSD obtidos foram 3,0 e 12,4% para o procedimento (1) e (2), respectivamente. Sendo assim, o procedimento (1) foi mais estável, reproduzível e por gerar uma maior resposta analítica, esta estratégia foi adotada para os próximos ensaios, podendo ser atribuído à eficiência do procedimento a melhor homogeneidade do filme imobilizado sobre a superfície do GCE.

#### *5.1.1.2. Efeito do eletrólito suporte e pH*

Para avaliar a influência do eletrólito suporte foram investigados KCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e tampões acetato e fosfato (ambos tampões  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 5). A intensidade da corrente de pico anódico demonstra que dentre os eletrólitos utilizados, o tampão fosfato (na inserção Figura 7A) forneceu a melhor resposta de corrente. Em seguida, avaliou-se a influência da concentração do tampão fosfato (pH 5) e os valores de corrente ( $I_{pa}$ ) obtidos foram  $5,3 \pm 0,4$ ,  $6,1 \pm 0,5$  e  $6,4 \pm 0,5 \mu\text{A}$ , para  $0,1$ ,  $0,2$  e  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente e os voltamogramas obtidos neste estudo são apresentados na Figura 7.

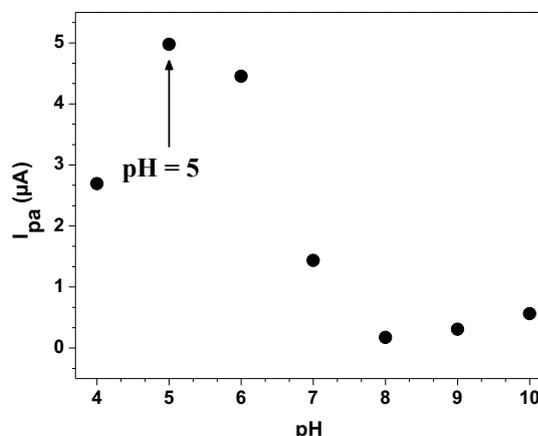
**Figura 7.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o filme CTS reticulada contendo CB com 40 ng de HQ immobilizada em tampão fosfato 0,1; 0,2 e 0,4 mol L<sup>-1</sup> (pH 5). Condições experimentais: E<sub>inicial</sub>: -0,1 V; E<sub>final</sub>: +0,3 V; amplitude: 25 mV; t<sub>m</sub>: 50 ms e v: 5 mV s<sup>-1</sup>. *Inset*: Relação composição do eletrólito vs corrente de HQ.



Pode-se observar que a  $I_{pa}$  aumentou até 0,4 mol L<sup>-1</sup>, no entanto foi selecionado 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pois na concentração de 0,4 mol L<sup>-1</sup>, o aumento de corrente não foi significativo ( $p = 0,07$ ) em um intervalo de confiança de 95%.

A influência do pH na resposta eletroquímica da HQ immobilizada no CB-CTS-ECH/GCE foi estudada na faixa de 4 a 10 e o gráfico da  $I_{pa}$  vs. pH é mostrado na Figura 8.

**Figura 8.** Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica de 40 ng de HQ immobilizada em HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, E<sub>inicial</sub>: -0,1 V; E<sub>final</sub>: +0,35 V; amplitude: 25 mV; t<sub>m</sub>: 50 ms e v: 5 mV s<sup>-1</sup>.



As correntes ( $I_{pa}$ ) obtidas demonstram que o pH influencia diretamente na reação de oxidação da HQ. Entre o pH 4 e 5, a corrente do pico de oxidação da HQ foi maior, porém com o aumento do pH esse sinal diminuiu gradualmente, como esperado, uma vez que a reação redox envolve prótons. Sendo assim, foi selecionado o tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e o pH 5 para os próximos estudos.

### 5.1.2. Avaliação dos parâmetros por DPV

Após o preparo do eletrodo, os parâmetros da DPV como velocidade de varredura, amplitude e tempo de modulação foram avaliados. O estudo desses parâmetros é importante, uma vez que estão diretamente relacionados à resolução e a magnitude dos picos. A Tabela 2 resume os intervalos avaliados para cada parâmetro e os valores selecionados, respectivamente.

**Tabela 2.** Parâmetros experimentais DPV investigados e valores selecionados.

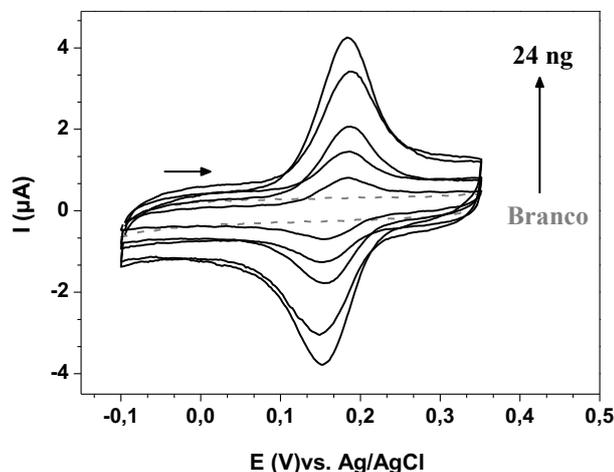
Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ )	2,5 – 10	5
Amplitude (mV)	10 – 100	80
Tempo de modulação (ms)	10 – 40	35

A seleção dos valores para cada parâmetro foi feita, levando-se em consideração a maior magnitude de corrente anódica ( $I_{pa}$ ) e melhor resolução do sinal de HQ imobilizada (40 ng) no HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE. Sendo assim, dentre os parâmetros avaliados, selecionou-se a velocidade de varredura, amplitude e tempo de modulação de  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , 80 mV e 35 ms, respectivamente.

### 5.1.3. Resposta eletroquímica das moléculas de HQ imobilizadas

A eletroatividade das moléculas de HQ imobilizadas no filme de CTS contendo CB foram investigadas utilizando a CV. Na Figura 9 são mostrados os voltamogramas cíclicos para o eletrodo HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE, contendo diferentes quantidades de HQ imobilizada.

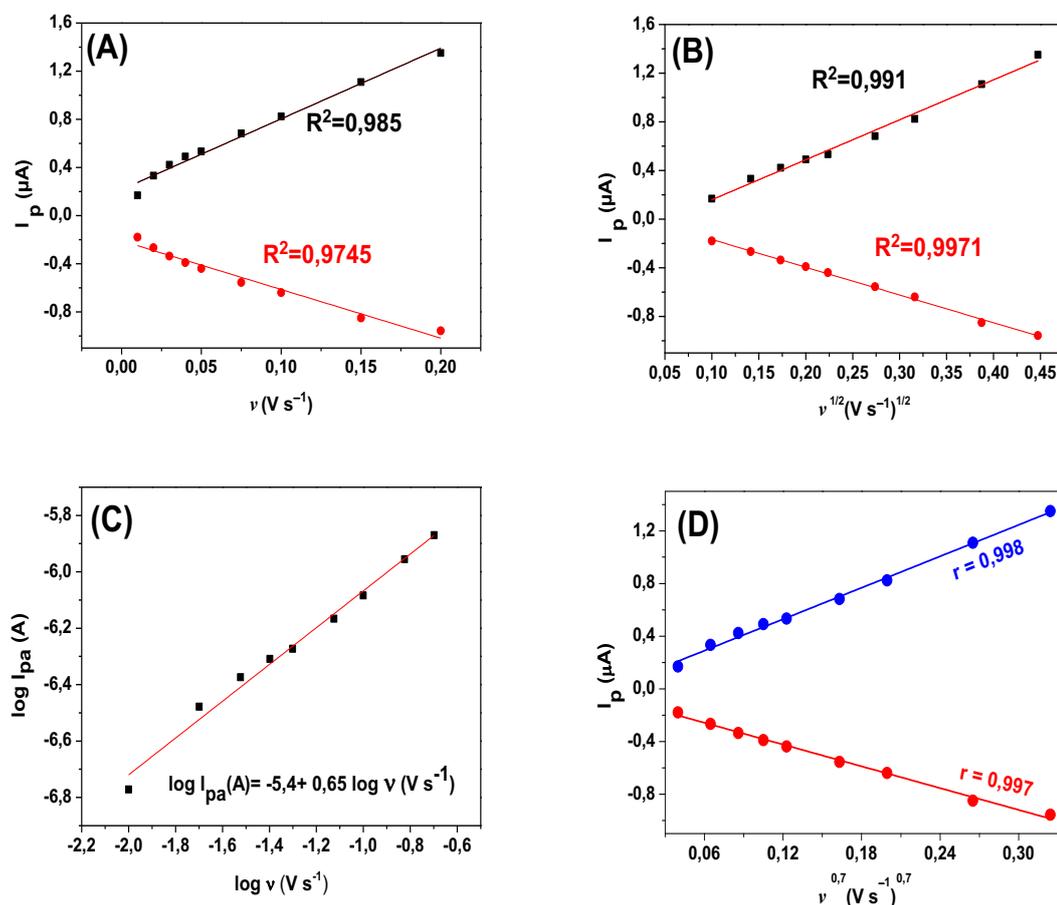
**Figura 9.** Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE contendo 2,7, 5,4, 11, 16 e 24 ng de HQ imobilizada em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5) em um intervalo de potenciais entre  $-0,1 \text{ V}$  e  $+0,35 \text{ V}$  e  $\nu 50 \text{ mV s}^{-1}$ .



É possível observar que a molécula de HQ imobilizada apresentou um pico de oxidação em  $+0,18 \text{ V}$  e um pico de redução em  $+0,15 \text{ V}$ , resultando em uma separação de potencial entre os picos anódico e catódico ( $\Delta E_p$ ) em torno de  $30 \text{ mV}$ , valor próximo ao esperado ( $29,6 \text{ mV}$ ) em processos envolvendo a transferência de dois elétrons (BRETT e BRETT, 1993). O potencial do par redox independe da massa de HQ imobilizada e a relação entre a corrente dos picos anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) foi próximo a 1. Esse conjunto de informações indica um comportamento típico de processos reversíveis (BRETT e BRETT, 1993; BARD, 2001).

O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica do  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE no intervalo de  $10$  a  $200 \text{ mV s}^{-1}$  foi investigado e a relação das correntes de pico anódico e catódico estão demonstrados na Figura 10.

**Figura 10.** Relação entre (A)  $I_p$  vs  $v$  (B)  $I_p$  vs raiz da  $v^{1/2}$  (C)  $\log I_{pa}$  vs  $\log v$  (D)  $I_p$  vs  $v^{0,7}$  do eletrodo modificado de  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE na presença de 11 ng de HQ imobilizada de 10 a 200  $mV s^{-1}$ . Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol  $L^{-1}$  (pH 5,0),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,35 V.



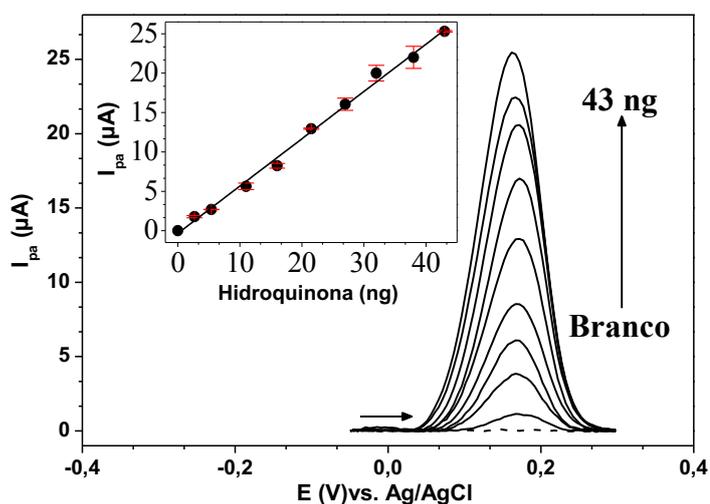
Como pode ser observado na Figura 10, as correntes de pico anódica (-) e catódica (-) variaram linearmente com o aumento da velocidade de varredura (Figura 10A) e com a raiz da velocidade de varredura (Figura 10B) podendo-se sugerir que o processo pode ser misto, ou seja, controlado tanto por difusão como por adsorção (BRETT e BRETT, 1993). Além disso, o logaritmo da corrente de pico anódico ( $\log I_{pa}$ ) variou linearmente com o logaritmo da velocidade de varredura ( $\log v$ ), obtendo-se um coeficiente angular igual (Figura 10C) a 0,65, valor reportado para processos mistos, ou seja, processos controlados por difusão e adsorção (BRETT e BRETT, 1993). Para confirmar esse comportamento foi feita a relação das correntes de pico anódica (-) e catódica (-) com a  $v^{0,7}$ , no qual podemos perceber (Figura 10D) uma relação linear com coeficientes de correlação de 0,998 e 0,997, respectivamente. Esse comportamento

está de acordo com trabalhos relacionados à eletroquímica de micropartículas orgânicas imobilizadas (KOMORSKY-LOVRIČ *et al.*, 1997), no qual o sinal analítico observado é o resultado da média de micropartículas imobilizadas contendo diferentes tamanhos.

#### 5.1.4. Validação do método e estabilidade do $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE

Após a otimização dos parâmetros experimentais, foi avaliado o desempenho analítico do método utilizando a DPV. Os parâmetros avaliados foram faixa linear da curva de calibração, LOD, LOQ, exatidão, precisão, estabilidade e repetibilidade do eletrodo proposto. Na Figura 11 são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial e a respectiva curva analítica (na inserção Figura 11) para o  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE com diferentes massas (ng) de HQ imobilizada.

**Figura 11.** Voltamogramas de DPV contendo diferentes massas de HQ imobilizada (2,7, 5,4, 11, 16, 21,5, 27, 32, 38 e 43 ng) no  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,3 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $v$ : 5 mV s<sup>-1</sup>. *Inset*: curva analítica ( $I_{pa}$  versus massa de HQ).



O sinal analítico da eletrooxidação da HQ foi linear ( $r=0,997$ ) na faixa de 2,7 a 43 ng, obtendo a equação de regressão linear (inserção na Figura 11)  $I_{pa}$  (A) =  $-(3 \pm 1) \times 10^{-7} + (6 \pm 1) \text{ massa de HQ} \times 10^2$  (ng).

Os valores calculados de LOD e LOQ foram 0,045 e 0,15 ng de HQ, respectivamente, o que demonstra que a associação do filme de CTS com as nanopartículas de CB combinado a VIM, garantem uma alta sensibilidade analítica e um baixo LOD para o método proposto. Na Tabela 3 é demonstrado a comparação desses resultados com outros trabalhos da literatura que utilizam técnicas voltamétricas para a determinação de HQ.

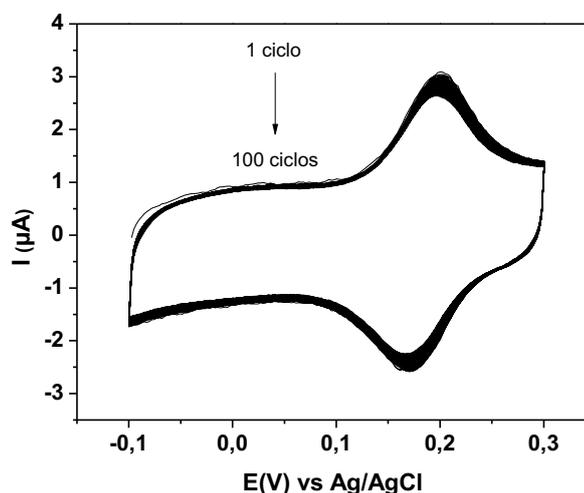
**Tabela 3.** Determinação de HQ utilizando diferentes técnicas voltamétricas

Eletrodo	Técnica	LOD	Referência
Eletrodo impresso	DPV	2,70 $\mu\text{mol L}^{-1}$	ARAGÓ <i>et al.</i> , 2016
Eletrodo modificado (GR-TiO <sub>2</sub> /GCE)	DPV	0,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$	ZHANG <i>et al.</i> , 2014
Filme imobilizado sobre a pasta de carbono (eosin Y/CPE)	DPV	0,79 $\mu\text{mol L}^{-1}$	GANESH e SWAMY, 2016
Eletrodo de pasta de carbono modificado com (poly (NG B))	SWV	0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	KUSKUR <i>et al.</i> , 2017
Eletrodo de pasta de carbono modificado (AuNPs-MPS)	SWV	1,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	TASHKHOURIAN <i>et al.</i> , 2016
Eletrodo modificado (Nafion/MWCNTs/CDs/MWCNTs)	DPV	0,07 $\mu\text{mol L}^{-1}$	WEI <i>et al.</i> , 2014
HQ <sub>(imob.)</sub> -CB-CTS-ECH/GCE	DPV	40,9 $\text{pmol L}^{-1}$	Proposto

O método proposto apresentou um menor LOD quando comparado a outros métodos reportados na literatura. É importante ressaltar que os estudos comparativos citados na Tabela 3 a HQ encontra-se em solução, pois até o momento, não existe estudos dedicados a HQ imobilizada no eletrodo.

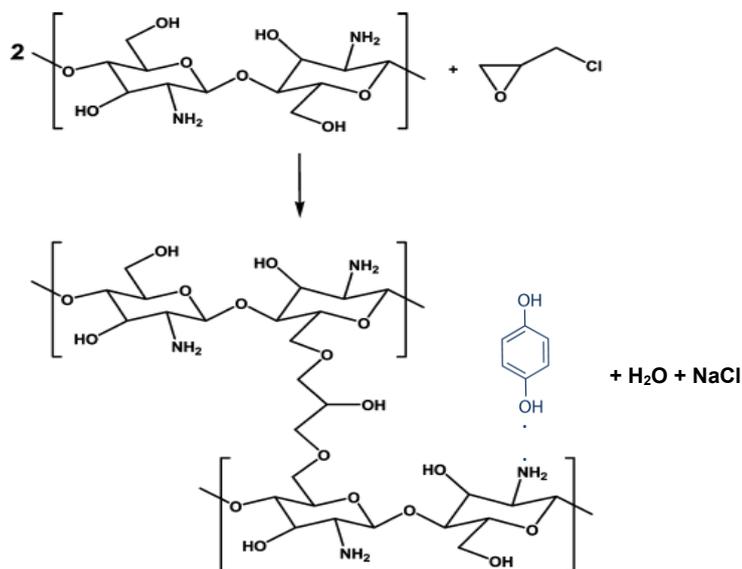
A confirmação que a HQ permanece imobilizada no filme de CTS reticulada à base de CB foi observada através do estudo feito por CV (100 ciclos) e os resultados estão demonstrados na Figura 12.

**Figura 12.** Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) empregando o eletrodo modificado de HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE na presença de 11 ng de padrão de HQ imobilizada. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5), em um intervalo de potenciais entre -0,1 V e +0,3 e  $\nu$ : 50 mV s<sup>-1</sup>.



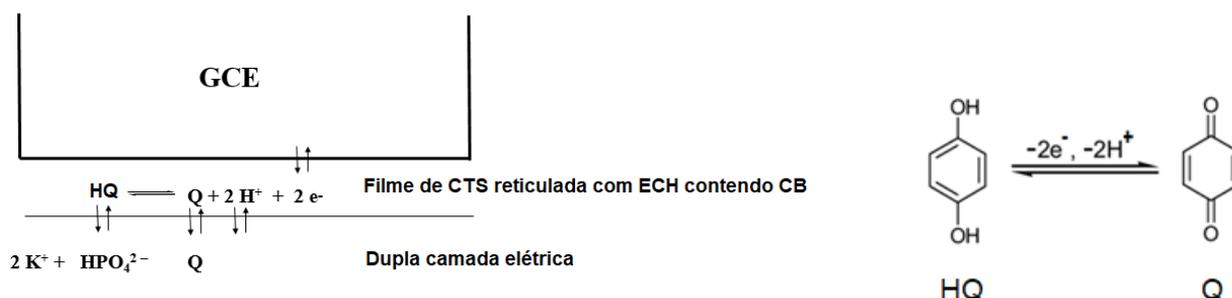
Como pode ser observado na Figura 12, os valores de corrente praticamente não são alterados e os valores de RSD obtidos foram 5,3 e 10,8% para a corrente anódica e catódica, respectivamente. A alta estabilidade da HQ pode ser atribuída às ligações de hidrogênio entre os grupos OH<sup>-</sup> da molécula de HQ e grupos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> da molécula de CTS e/ou pela formação da quinidrona, substância constituída de moléculas de HQ e quinona (Q), alternadas e enlaçadas por ligações de hidrogênio (KOMORSKY-LOVRIČ *et al.*, 1999). A ilustração da reação da HQ com quitosana reticulada com ECH é demonstrada na Figura 13.

**Figura 13.** Ilustração representativa da reação da HQ com quitosana reticulada com ECH (PAULIUKAITE, 2009).



A reação redox da HQ pode ocorrer devido à inserção dos íons do eletrólito na superfície das micropartículas. Uma vez que a micropartícula imobilizada é um bom condutor eletrônico e o analito apresenta certa solubilidade na solução (SCHOLZ *et al.*, 1997), é possível que a camada de difusão esteja na interface da junção trifásica, podendo assim a transferência de massa ser descrita pelo modelo de difusão planar (LOVRIĆ *et al.*, 2000). Além disso, considerando os voltamogramas cíclicos da Figura 9, as correntes de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) aumentam através do aumento da massa de HQ imobilizada, indicando assim a possibilidade de determinação quantitativa da HQ usando a VIM. Através desse conjunto de dados é possível inferir que o processo envolvido nesse sistema é genuinamente de estado sólido onde a transferência de elétrons e a troca de íons ocorrem simultaneamente (SCHOLZ, 2015). Na Figura 14 é apresentado um esquema representativo da possível reação redox da HQ imobilizada no filme de quitosana reticulada com ECH contendo CB.

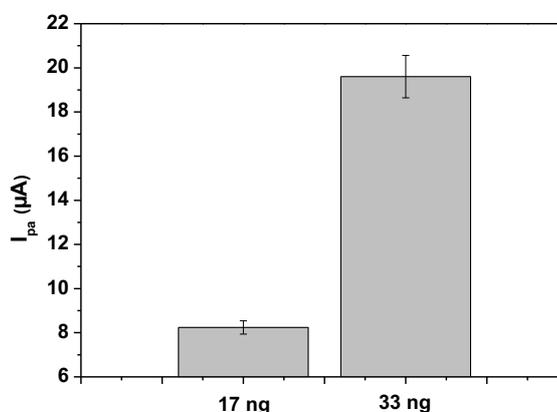
**Figura 14.** Esquema representativo da possível reação redox da HQ immobilizada no filme de quitosana reticulada com ECH contendo CB.



A reação redox da hidroquinona para quinona envolve 2 prótons e 2 elétrons. No sistema eletrodico de três fases acima descrito, a HQ immobilizada no filme de CTS reticulada com ECH troca, simultaneamente, elétrons com o condutor (CB) e íons com a solução do eletrólito (tampão fosfato).

A repetibilidade do eletrodo modificado foi avaliada em dois níveis de massa de HQ immobilizada (17 ng e 33 ng) e os valores de corrente do pico anódico estão demonstrados na Figura 15.

**Figura 15.** Avaliação da repetibilidade do  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE contendo 17 ng e 33 ng de HQ immobilizada. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,35 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $\nu$ :  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .



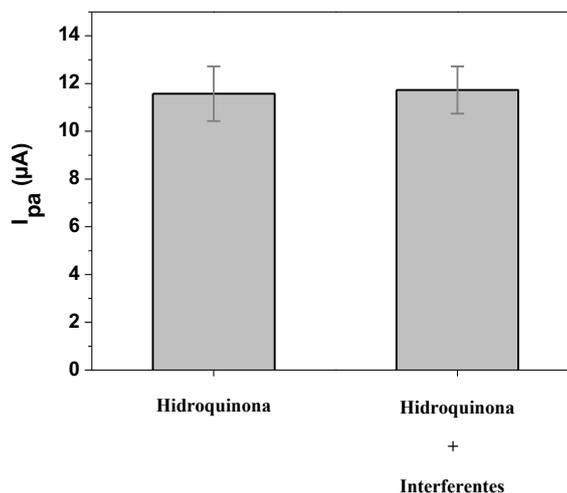
Como podem ser observados na Figura 15, os dois níveis de massa de HQ imobilizada, apresentaram valores de corrente de  $8,3 \pm 0,3 \mu\text{A}$  para 17 ng e  $19,6 \pm 0,9 \mu\text{A}$  para 33 ng, com um desvio padrão relativo (RSD) menor que 5,0% em ambas as massas imobilizadas, evidenciando a repetibilidade e viabilidade na preparação do eletrodo proposto.

A estabilidade da resposta do eletrodo modificado, contendo 22 ng de HQ imobilizada, foi avaliada através de 30 sucessivas medidas usando a DPV. Com este estudo, obteve-se um RSD de 6,5% (resultado não mostrado) para a corrente de pico anódica ( $13,1 \pm 0,8 \mu\text{A}$ ). Por conseguinte, depois de imobilizada no filme CB-CTS-ECH/GCE, uma pequena massa de HQ foi perdida do eletrodo e esse comportamento pode ser justificado pela mobilidade das moléculas de HQ do filme para o meio aquoso, porém como essa massa perdida é muito pequena, não compromete a estabilidade do eletrodo desenvolvido, podendo assim ser aplicado em sucessivas medições utilizando a DPV.

#### **5.1.5. Estudo de interferente**

A comparação do sinal analítico da HQ na presença e na ausência dos possíveis interferentes é apresentada na Figura 16. A fluocinolona acetonide e a tretinoína em relação a HQ foram imobilizadas em proporções 400:1 e 80:1, respectivamente. Cabe salientar que as proporções imobilizadas no  $\text{HQ}_{(\text{imob.})}$ -CB-CTS-ECH/GCE são tipicamente encontradas nos produtos de cosméticos comerciais.

**Figura 16.** Gráfico obtido empregando o eletrodo modificado de  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE na presença e na ausência dos possíveis interferentes (fluocinolona acetonide e a tretinoína). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,35 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $v$ :  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

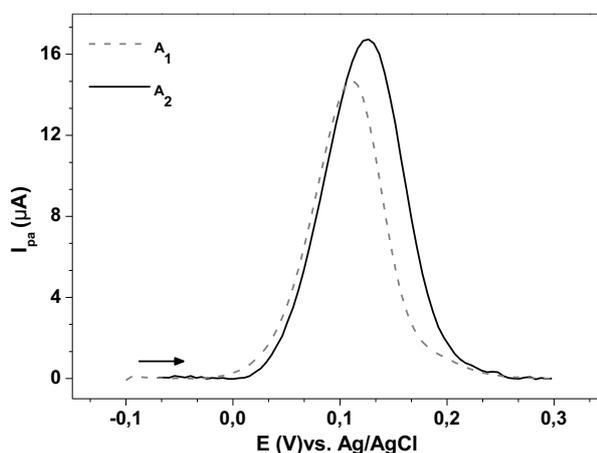


Valor de erro relativo igual a -1,7% foi obtido entre os sinais de corrente do pico anódico do padrão de HQ na presença ( $11,5 \pm 0,9 \mu\text{A}$ ) e na ausência dos possíveis interferentes ( $11,7 \pm 1,1 \mu\text{A}$ ). Este valor baixo de erro relativo demonstra a seletividade do procedimento proposto relacionado às principais substâncias presentes nas amostras analisadas neste trabalho.

#### 5.1.6. Determinação de HQ em amostras de creme dermatológico

O método proposto baseado na associação da técnica de VIM com o filme CTS reticulada combinado com CB foi aplicado para a determinação de HQ em duas amostras comerciais de cremes dermatológicos e os resultados estão demonstrados na Figura 17.

**Figura 17.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos no  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE contendo 700 ng de creme dermatológico ( $A_1$  e  $A_2$ ) imobilizado. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{inicial}$ : -0,1 V;  $E_{final}$ : +0,3 V; amplitude: 80 mV;  $t_m$ : 35 ms e  $\nu$ : 5 mV s<sup>-1</sup>.



Os resultados obtidos da análise das amostras feita pelo método proposto e comparativo (UV-vis) estão resumidos na Tabela 4 e é possível observar resultados concordantes entre ambos os métodos.

**Tabela 4.** Valores de HQ quantificados em amostras de creme dermatológico ( $A_1$  e  $A_2$ ), pelos métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n=3)

Amostra	Valor rotulado	HQ (%)		$E_1^*(\%)$	$E_2^{**}(\%)$
		Método comparativo	Método proposto		
$A_1$	4,0	4,4 ± 0,1	3,8 ± 0,1	5,0	13,6
$A_2$	4,0	4,6 ± 0,1	4,2 ± 0,1	5,0	8,7

\* $E_1 = 100 \times (\text{proposto} - \text{rotulado}) / \text{rotulado}$

\*\* $E_2 = 100 \times (\text{proposto} - \text{comparativo}) / \text{comparativo}$

As concentrações de HQ quantificadas nas amostras pelo método comparativo e proposto foram respectivamente de 4,4 ± 0,1 e 3,8 ± 0,1 para  $A_1$  e 4,6 ± 0,1 e 4,2 ± 0,1 para  $A_2$ . O teor de HQ especificado pelos fabricantes é de 4% m/m para ambas as amostras e os níveis de concentração obtidos com o método proposto foram concordantes aos descritos pelos fabricantes. No entanto, a amostra  $A_2$  apresentou

uma concentração de HQ superior ao recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (4% m/m) (ANVISA, 2000). Os valores do erro relativo obtidos pela comparação do teor de HQ presente nos rótulos com os valores obtidos pelo procedimento proposto (VIM) ( $E_1$ ) foram inferiores a 5,0%. Comparando os resultados obtidos pelo procedimento proposto e comparativo, os valores do erro relativo ( $E_2$ ) para  $A_1$  e  $A_2$  foram 13,6% e 8,7%, respectivamente, demonstrando a concordância dos resultados obtidos por ambos os métodos. Além disso, o teste- $t$  pareado foi aplicado, sendo o  $t_{\text{experimental}}$  (7,97) inferior ao valor tabelado (12,71) a um nível de confiança de 95%, provando que os resultados para ambos os procedimentos são estatisticamente iguais. Este conjunto de resultados comprovam a precisão e a confiabilidade da aplicação do método proposto, demonstrando a viabilidade desta estratégia analítica para o monitoramento de HQ em amostras de creme dermatológico.

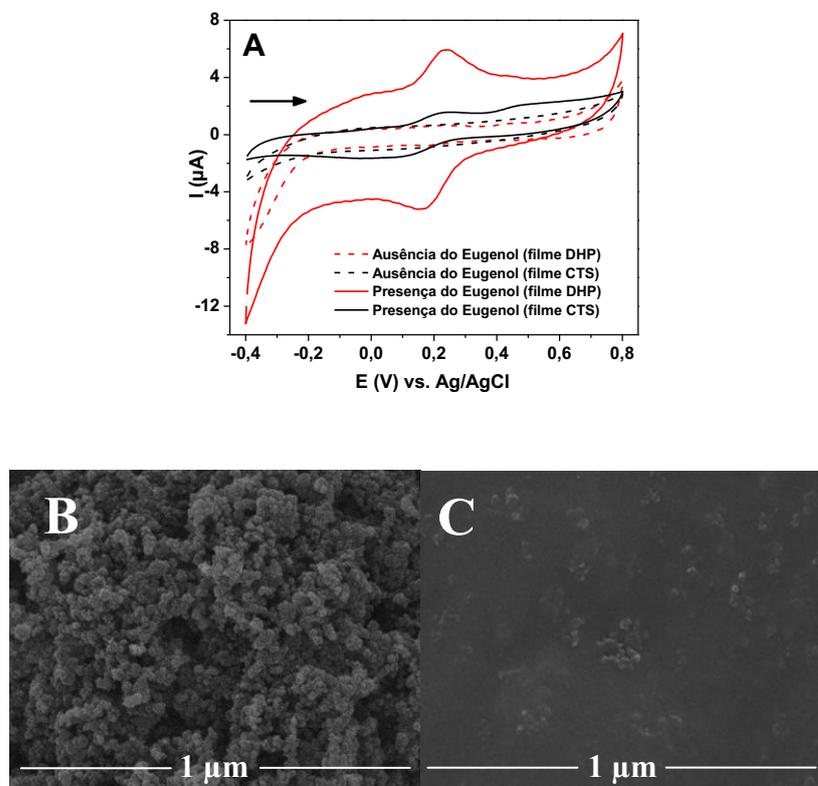
## 5.2. PARTE 2 – Determinação de eugenol

### 5.2.1. Otimização das condições experimentais

#### 5.2.1.1. Seleção do filme

A resposta eletroquímica da imobilização do EU foi investigada usando os filmes de DHP e CTS reticulada (detalhes experimentais estão descritos na seção 4.4.2). Na Figura 18 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para os filmes de DHP e CTS reticulada na ausência e na presença de 29  $\mu\text{g}$  de padrão de EU imobilizado (A) assim como as micrografias eletrônicas de varredura do padrão de EU imobilizado nos filmes de DHP (B) e CTS reticulada (C).

**Figura 18.** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para os filmes de DHP (-) e CTS reticulada (-) na ausência e na presença de 29  $\mu\text{g}$  de padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 7), de -0,4 V a +0,8 V e  $\nu$ : 50 mV s<sup>-1</sup>. Imagens de MEV contendo EU imobilizado nos filmes de DHP (B) e CTS reticulada (C).

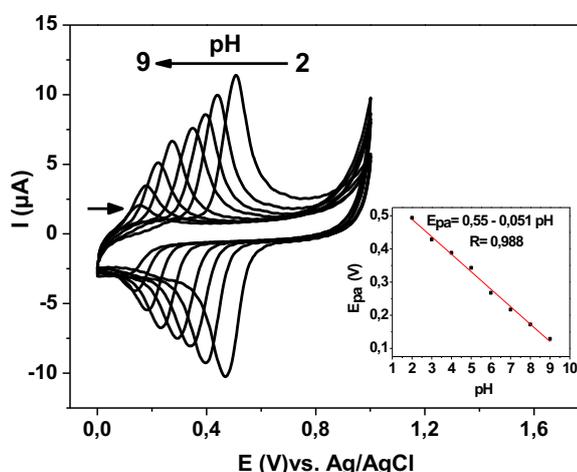


Como pode ser visto na Figura 18A, nos voltamogramas obtidos na ausência de EU (na faixa de potencial de -0,4 a 0,8 V) não foram observados picos de redução e oxidação para ambos os filmes. No entanto, os voltamogramas cíclicos obtidos em ambos os filmes contendo EU imobilizado, apresentaram um par de picos redox demonstrando que ambos os filmes podem ser aplicados para a imobilização do EU. O EU apresentou maior intensidade de corrente com o filme de DHP quando comparado ao filme de CTS, sendo assim o filme de DHP foi selecionado para estudos posteriores. Observa-se na Figura 18B um enovelamento do CB com o DHP e uma distribuição uniforme na presença de EU imobilizado. Adicionalmente, a morfologia do filme de DHP apresenta maior área superficial quando comparado com o filme de CTS (Figura 18C), proporcionando uma melhor exposição das moléculas de EU ao eletrólito suporte, justificando assim o seu melhor desempenho.

#### 5.2.1.2. Efeito do pH

Estudos utilizando a CV foram feitos com o objetivo de avaliar o efeito do pH (de 2 a 9) nas respostas de corrente dos picos anódico e catódico do EU imobilizado no  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  e os resultados estão demonstrados na Figura 19.

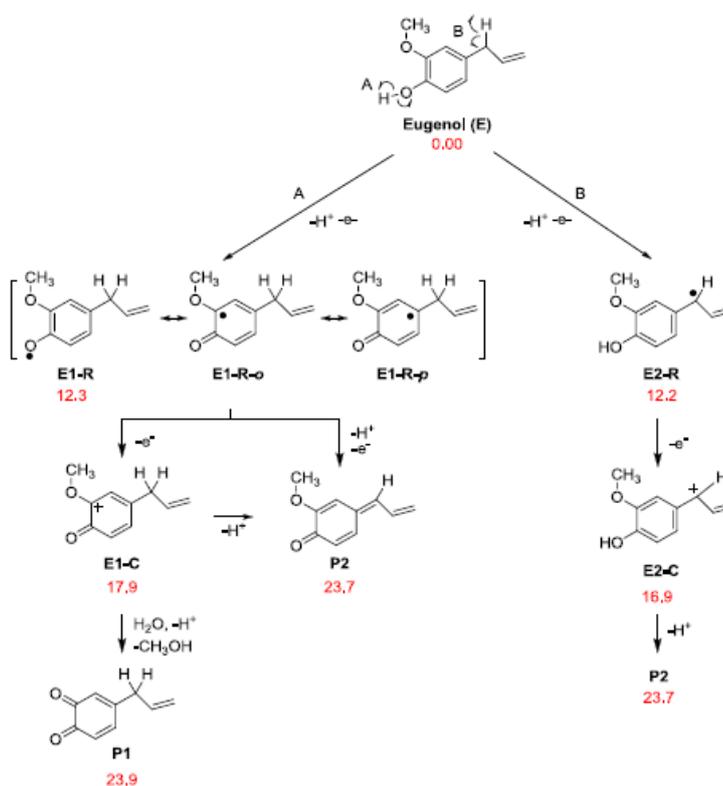
**Figura 19.** Voltamogramas cíclicos do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 29  $\mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> em diferentes valores de pH (2 a 9), em um intervalo de potenciais entre 0 V e +1,0 V e  $\nu$ : 50 mV s<sup>-1</sup>. *Inset*: relação da  $E_{\text{pa}}$  vs. pH.



É possível observar que o aumento do pH da solução leva um deslocamento dos potenciais para valores mais negativos e diminuição das correntes dos picos (anódico e catódico). A inclinação da reta mostrada na inserção da Figura 19, relação da  $E_{pa}$  vs. pH, apresentou um valor de  $-51$  mV/pH, próximo aos valores encontrados na literatura ( $59$  mV/pH) para sistemas que envolvem o mesmo número de prótons e elétrons (NEMATOLLAHI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2011).

De acordo com Yildiz *et al.* (YILDIZ *et al.*, 2017) a eletrooxidação do EU (Figura 20) é um processo irreversível envolvendo duas etapas, na primeira ocorre a formação de um radical e na segunda etapa a oxidação do carbono  $sp^3$  para carbono  $sp^2$ , sendo este último passo responsável pelo comportamento irreversível.

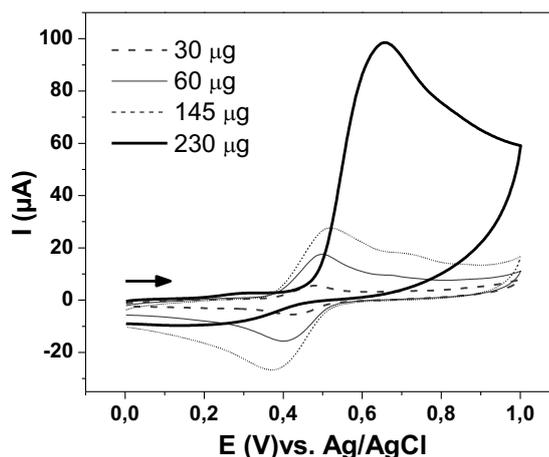
**Figura 20.** Ilustração representativa da reação redox do EU (YILDIZ, 2017).



O comportamento totalmente reversível da resposta do eugenol apresentado na Figura 19 pode ser atribuído ao filme CB-DHP, o qual estabiliza o radical formado na primeira etapa de oxidação. Esse comportamento pode ser confirmado pelos

voltamogramas cíclicos obtidos nos eletrodos contendo diferentes massas de eugenol imobilizado ( $\mu\text{g}$ ) e estão mostrados na Figura 21.

**Figura 21.** Voltamogramas cíclicos do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 30, 60, 145 e 230  $\mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 2), em um intervalo de potenciais entre 0 V e +1,0 V e  $\nu$ : 50  $\text{mV s}^{-1}$ .

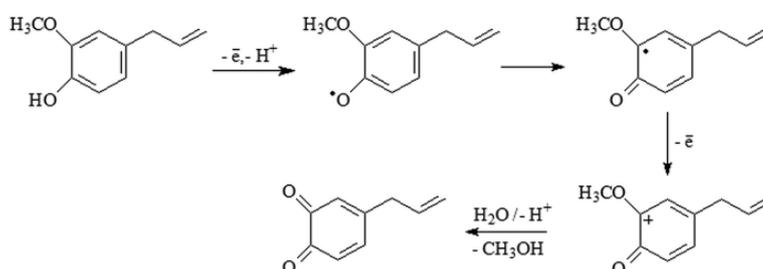


É possível observar na Figura 21 o efeito da estabilização do filme CB-DHP em uma pequena massa de EU imobilizado, e quando esta massa é aumentada (por exemplo, 230  $\mu\text{g}$ ) observa-se o surgimento de um comportamento irreversível no sistema. Com base no mecanismo proposto por Yildiz et al. (YILDIZ *et al.*, 2017) o comportamento reversível do eugenol, apresentado neste estudo, envolve um próton e um elétron.

Na Figura 19, pode-se observar uma diminuição da magnitude de corrente dos processos anódico e catódico em relação ao aumento do pH, este comportamento pode ser justificado pelo valor do  $\text{pK}_a$  do EU (10,41) (LUQUE *et al.*, 2000). Através do valor do  $\text{pK}_a$  é possível calcular o  $K_a$  ( $3,89 \times 10^{-11}$ ) e o  $K_b$  ( $2,57 \times 10^{-4}$ ). Levando em consideração a teoria de ácido-base de Brønsted-Lowry relacionado aos valores de  $K_a$  e  $K_b$  calculados, é possível afirmar que a molécula de EU possui característica de uma base, ou seja, tem tendência de receber prótons e considerando o comportamento redox do EU apresentado na Figura 19, a presença de íons  $\text{H}^+$  é necessária tanto na etapa de oxidação quanto na redução.

Em elevados valores de pH (baixa concentração de íons  $H^+$  em solução) o EU encontra-se totalmente ionizado devido a remoção do íon  $H^+$ . Por outro lado, em valores baixos de pH (maior concentração de íons  $H^+$  em solução), a reação redox do EU é favorecida, e esse comportamento pode ser atribuído ao aumento da densidade de carga positiva em consequência do aumento da protonação do grupo (C=O) da molécula do EU (ZIYATDINOVA *et al.*, 2013) demonstrados na Figura 22.

**Figura 22.** Reação redox do EU (ZIYATDINOVA *et al.*, 2013).

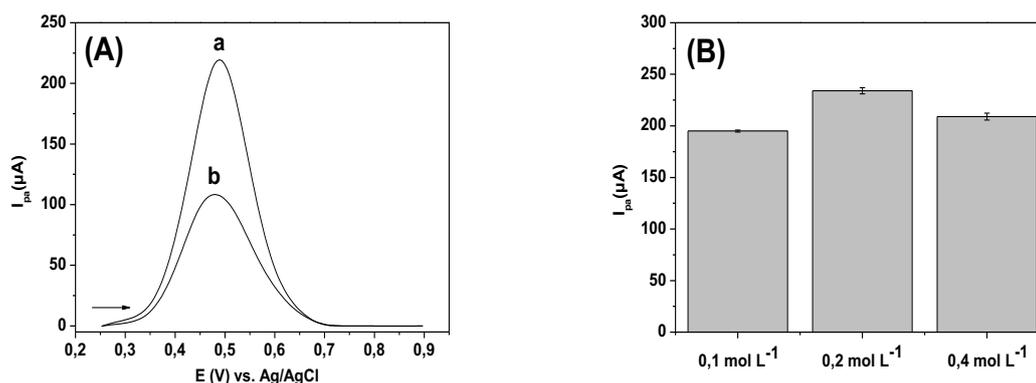


Uma vez que as maiores intensidades de corrente foram obtidas quando utilizou-se pH 2, este foi selecionado para os estudos posteriores.

### 5.2.1.3. Seleção do eletrólito suporte e concentração

A influência de diferentes eletrólitos suporte na resposta voltamétrica do EU imobilizado no  $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE foi avaliado utilizando a SWV. Para este estudo foram investigados o tampão Britton–Robinson ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) e o tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) ambos em pH 2 e os voltamogramas obtidos em cada condição de eletrólito suporte encontram-se na Figura 23.

**Figura 23.** (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo  $29 \mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (a) e tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  (b) em pH 2 (B) Gráfico do efeito da concentração do tampão fosfato (pH 2) em relação à resposta voltamétrica de  $29 \mu\text{g}$  de EU imobilizado. Condições experimentais:  $E_{\text{inicial}}$ :  $0,25 \text{ V}$ ;  $E_{\text{final}}$ :  $0,9 \text{ V}$ ; amplitude:  $70 \text{ mV}$ ; Frequência:  $30 \text{ Hz}$  e  $E_{\text{step}}$ :  $5 \text{ mV}$ .



O valor do potencial de pico ( $E_{pa}$ ) obtido (Figura 23A) na oxidação do EU foi o mesmo em ambos os eletrólitos, porém a corrente ( $I_{pa}$ ) foi 2,10 vezes maior utilizando o tampão fosfato.

Selecionado o tampão fosfato como eletrólito suporte, avaliou-se o efeito da sua concentração e os valores de corrente ( $I_{pa}$ ) obtidos foram  $190 \pm 1,0$ ;  $234 \pm 3,0$  e  $210 \pm 3,4 \mu\text{A}$ , para  $0,1$ ,  $0,2$  e  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Com base nos resultados obtidos (Figura 23B) os valores de corrente em  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  foi aproximadamente 18% e 10% superior aos valores de corrente obtidas para  $0,1$  e  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Levando em consideração a maior magnitude de corrente anódica,  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  foi selecionado para estudos posteriores.

### 5.2.2. Avaliação dos parâmetros por SWV

Os parâmetros experimentais da SWV foram otimizados utilizando o  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo  $29 \mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2) e os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros experimentais SWV investigados e valores selecionados.

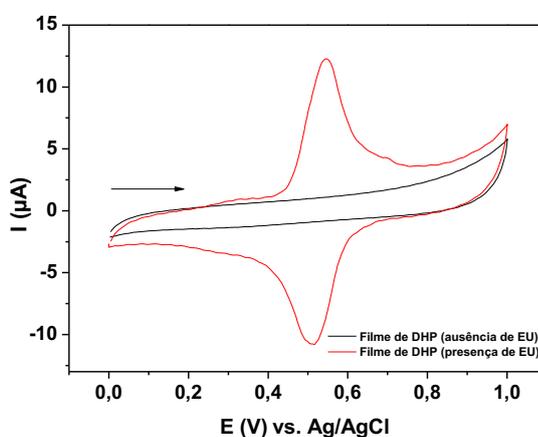
Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Amplitude (mV)	10 – 170	90
Frequência (Hz)	10 – 45	30
$E_{\text{step}}$ (mV)	1 – 9	5

A seleção dos valores para cada parâmetro foi feita, levando-se em consideração a maior magnitude de corrente anódica ( $I_{\text{pa}}$ ) e melhor resolução do sinal de EU imobilizado (29  $\mu\text{g}$ ) no EU  $_{(\text{imob.})}$ -CB-DHP/GCE. Sendo assim, os efeitos da amplitude, frequência e  $E_{\text{step}}$  na corrente do pico anódico do EU selecionados foram 90 mV, 30 Hz e 5 mV, respectivamente.

### 5.2.3. Resposta eletroquímica das moléculas de eugenol imobilizadas em função da velocidade de varredura

A avaliação do perfil voltamétrico do EU quando imobilizado em um filme condutor (CB/DHP) foi investigado por CV na presença e na ausência de EU (29  $\mu\text{g}$  de padrão) em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 2) e os resultados estão apresentados na Figura 24.

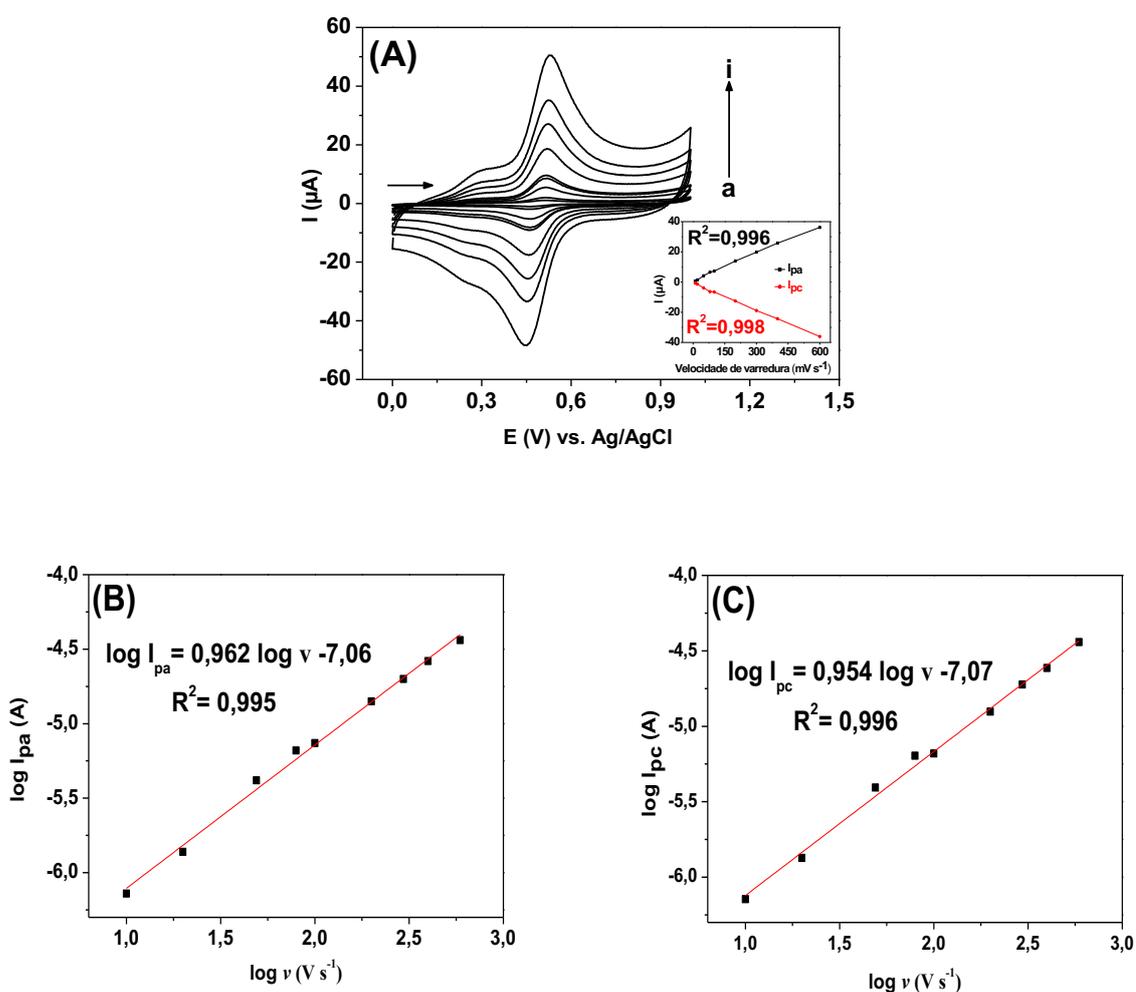
**Figura 24.** Voltamogramas cíclicos ( $v$ : 50 mV s<sup>-1</sup>) do eletrodo modificado EU $_{(\text{imob.})}$ -CB-DHP/GCE na ausência (-) e na presença (-) de 29  $\mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado, obtidos em 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 2), em um intervalo de potenciais entre 0 V e +1,0 V.



Como pode ser observado na Figura 24, o EU apresenta picos tanto no sentido positivo de varredura de potencial (oxidação) quanto no sentido negativo de varredura de potencial (redução). Os valores de potencial de oxidação e redução do EU (+0,50 e +0,47 V) apresentaram uma pequena separação de potencial (30 mV) e uma relação entre a corrente dos picos anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) próximo a 1. Essas informações são indicativas de um processo reversível (BRETT e BRETT, 1993).

Além disso, foram realizados experimentos utilizando a CV em diferentes velocidades de varredura (10 a 600  $\text{mV s}^{-1}$ ) e os voltamogramas estão demonstrados na Figura 25.

**Figura 25.** (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 2) empregando o eletrodo modificado de  $\text{EU}_{(\text{imob.})}$ -CB-DHP/GCE com 20  $\mu\text{g}$  de EU imobilizado em (a) 10, (b) 20, (c) 50, (d) 80, (e) 100, (f) 200, (g) 300, (h) 400 e (i) 600  $\text{mV s}^{-1}$ . (Inset: gráfico  $I_p$  vs  $v$ ) (B) gráfico  $\log I_{pa}$  vs  $\log v$  e (C) gráfico  $\log I_{pc}$  vs  $\log v$ .

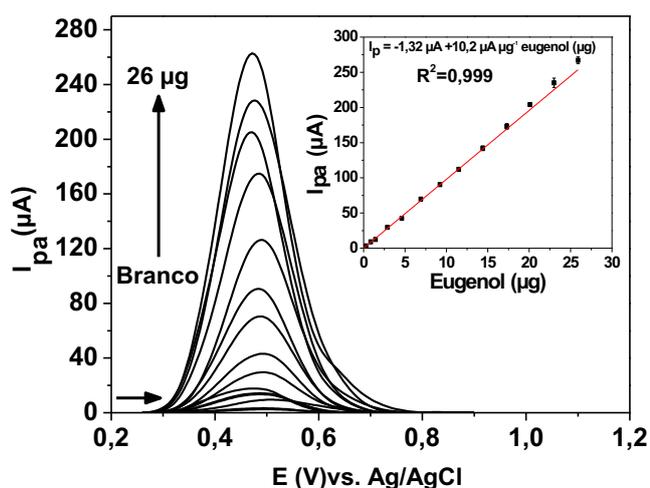


Observa-se na Figura 25A (*inset*) uma relação linear da corrente do pico anódico e catódico com o aumento da velocidade de varredura, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,996 e 0,998, respectivamente. Além disso, a relação entre  $\log I_p$  (anódica e catódica) *versus*  $\log \nu$  (10 a 600  $\text{mV s}^{-1}$ ) em ambos os casos (Figura 25B e 25C) apresentou coeficientes angulares de 0,962 e 0,954, respectivamente. Esse conjunto de informações indica que o processo envolvido é controlado por adsorção.

#### 5.2.4. Validação do método e estabilidade do $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$

Após a otimização dos parâmetros experimentais, foi avaliado o desempenho analítico do método utilizando a SWV. Os parâmetros avaliados foram linearidade da curva de calibração, LOD, LOQ, exatidão, precisão, estabilidade e repetibilidade do eletrodo proposto. A Figura 26 apresenta os voltamogramas obtidos em diferentes massas de EU imobilizado (0,029 a 26  $\mu\text{g}$ ) no  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  e a respectiva curva analítica (*inset* na Figura 26).

**Figura 26.** Voltamogramas de SWV contendo diferentes massas de EU imobilizado (0,03, 0,14, 0,29, 0,86, 1,4, 2,9, 4,6, 6,9, 9,2, 11,0, 14,0, 17,0, 20,0, 23,0 e 26,0  $\mu\text{g}$ ) no  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$ . Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5mV. *Inset*: curva analítica ( $I_{pa}$  *versus* massa de EU).



Como pode-se observar, a corrente de pico anódica aumenta linearmente com a massa de EU imobilizada no  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  em uma faixa de 0,029 a 26  $\mu\text{g}$ . A

equação da regressão linear e o coeficiente de determinação obtidos para a curva analítica do EU foram  $I_{pa} (\mu A) = -1,32 \mu A + 10,2 \mu A \mu g^{-1} EU (\mu g)$  e  $R^2 = 0,999$ , respectivamente. A partir da curva de calibração, calculou-se os valores de LOD e LOQ para EU e os valores obtidos foram de 0,13 e 0,42 ng, respectivamente.

Os resultados utilizando o método proposto foram comparados com outros trabalhos encontrados na literatura que aplicam técnicas voltamétricas para a determinação de EU utilizando diferentes eletrodos de trabalho e os resultados estão demonstrados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Comparação entre os valores de LOD obtidos para o método voltamétrico proposto utilizando o  $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE e para outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura.

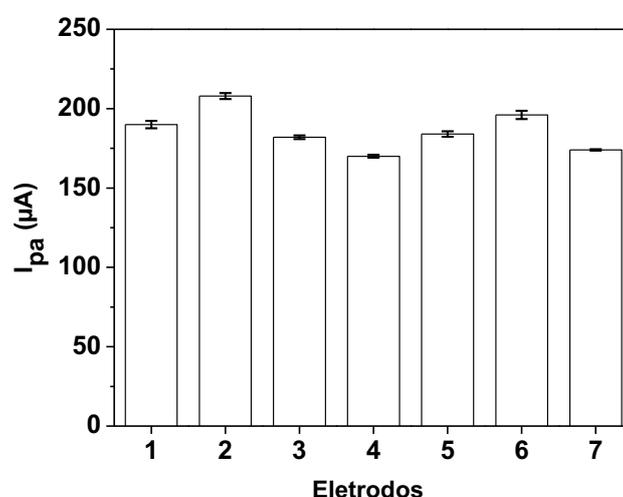
Eletrodo	Técnica	LOD	Referência
CPE modificado com nanopartículas de ouro	DPV	2,0 $\mu mol L^{-1}$	AFZALI <i>et al.</i> , 2014
Grafite	DPV	0,085 $\mu mol L^{-1}$	SAĞLAM <i>et al.</i> , 2016
GCE	SWV	0,010 mg $L^{-1}$	TONELLO <i>et al.</i> , 2016
Eletrodo modificado MIP/GN-CNTs-IL/GCE	LSV	10 $\mu mol L^{-1}$	YANG <i>et al.</i> , 2016
Eletrodo modificado Cu@AuNPs/GCE	LSV	0,042 $\mu g mL^{-1}$	LIN <i>et al.</i> , 2014
Eletrodo modificado Au/PDDA-G-MoS <sub>2</sub> /GCE	Amperometria	0,036 $\mu mol L^{-1}$	FENG <i>et al.</i> , 2014
$EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE	SWV	0,053 nmol $L^{-1}$	Proposto

Pode-se observar na Tabela 6 que o eletrodo proposto apresentou melhor resposta em termos de limite de detecção em comparação aos métodos reportados na literatura para a determinação de EU. Cabe salientar que nos trabalhos citados o EU encontra-se em solução, e esses estudos foram utilizados como comparativo, pois até o momento, não existe estudos dedicados ao EU imobilizado no eletrodo.

A repetibilidade e a estabilidade do eletrodo modificado foram investigadas nas condições otimizadas anteriormente (seção 4.2.2) e os valores de corrente do pico anódico monitorado em ambos os casos. Como pode ser observado na Figura 27, uma

pequena diferença de corrente foi obtida (RSD < 7%) entre os 7 eletrodos imobilizados (20  $\mu\text{g}$  de EU), comprovando que o procedimento de imobilização é eficiente e proporciona resultados com alta precisão.

**Figura 27.** Avaliação da repetibilidade do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 20  $\mu\text{g}$  de EU imobilizado. Condições experimentais SWV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5mV.



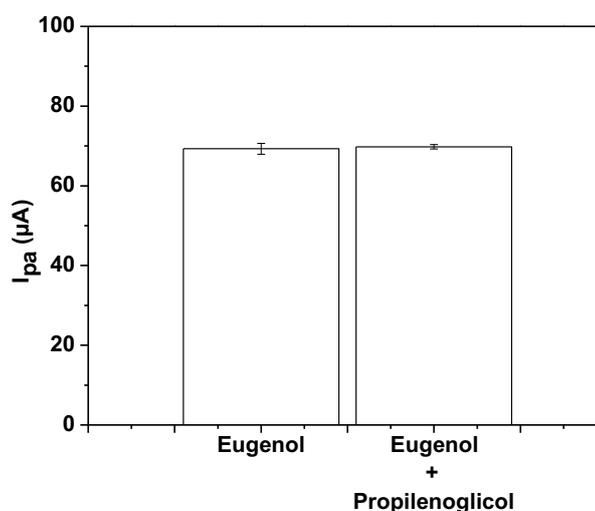
Posteriormente, foi feita a avaliação da estabilidade, onde a resposta do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo 6,9  $\mu\text{g}$  do padrão de EU imobilizado foi avaliado através de 30 sucessivas medições feitas por SWV. Um desvio padrão relativo menor que 6,6% (resultado não mostrado) para a corrente de pico anódica ( $65,3 \pm 4,3 \mu\text{A}$ ) foram obtidos entre as medidas, indicando que o eletrodo modificado além de apresentar boa estabilidade apresenta também um excelente desempenho analítico em termos de repetibilidade, possibilitando desta forma a utilização do eletrodo proposto nas análises voltamétricas.

### 5.2.5. Estudo de interferente

Para investigar a seletividade do  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$ , foram imobilizados na mesma proporção (1:1) o padrão de EU e o propilenoglicol (composto presente em todas as amostras de óleo de cravo analisadas neste trabalho). A massa imobilizada de ambos (EU e propilenoglicol) foi 6,9  $\mu\text{g}$  e como pode ser visualizado na Figura 28 a

presença do interferente não afeta a intensidade de corrente do pico anódico do padrão de EU.

**Figura 28.** Influência do propilenoglicol no sinal de corrente anódico do padrão de EU no eletrodo de  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$ . Condições experimentais SWV: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5 mV.

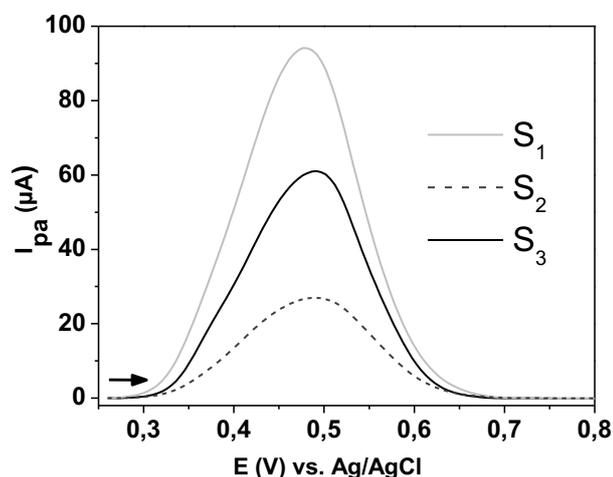


Cabe salientar que um erro relativo menor que 0,8% entre os sinais de corrente do pico anódico do padrão de EU na presença ( $69,3 \pm 1,6 \mu\text{A}$ ) e na ausência ( $69,8 \pm 0,5 \mu\text{A}$ ) do propilenoglicol foram obtidos o que permite afirmar que o propilenoglicol não apresenta efeito significativo ( $p = 0,41$ ) sobre o sinal de EU, em um intervalo de confiança de 95%.

### 5.2.6. Determinação de eugenol em amostras de produtos de higiene pessoal contendo óleo de cravo

A aplicabilidade do método proposto foi avaliada por meio da determinação de EU em três amostras de óleo de cravo ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ) pela imobilização de  $8,6 \mu\text{g}$  de  $S_1$  e  $S_3$  e  $72 \mu\text{g}$  de  $S_2$  (Figura 4, ver seção 4.5.2) e os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão mostrados na Figura 29.

**Figura 29.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos no  $\text{EU}_{(\text{imob.})}\text{-CB-DHP/GCE}$  contendo  $8,6 \mu\text{g}$  de óleo de cravo ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ). Condições experimentais SWV: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2),  $E_{\text{inicial}}$ : 0,25 V;  $E_{\text{final}}$ : 0,9 V; amplitude: 90 mV; Frequência: 30 Hz e  $E_{\text{step}}$ : 5mV.



A exatidão do método foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos com os resultados fornecidos pelo método comparativo (Espectrofotometria UV-vis) e os resultados estão demonstrados na tabela 7.

**Tabela 7.** Valores de EU quantificados em amostras de óleo de cravo ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ), pelos métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) ( $n=3$ )

Amostra	Concentração de EU (%)		E (%)
	Método comparativo	Método proposto	
$S_1$	$68,20 \pm 0,10$	$68,30 \pm 0,30$	0,15
$S_2$	$14,30 \pm 0,02$	$14,00 \pm 0,70$	2,10
$S_3$	$34,40 \pm 0,07$	$33,20 \pm 0,80$	3,50

$$n=3, E=100 \times (P - C) / C$$

Como pode ser observado na Tabela 7 as concentrações de EU nas amostras  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$  foram  $68,3 \pm 0,3$ ,  $14,0 \pm 0,7$  e  $33,2 \pm 0,8\%$ , respectivamente. Comparando os resultados, foram obtidos valores de erro relativo entre 0,15 e 3,5%, demonstrando uma excelente concordância dos dados obtidos por ambos os métodos. Além disso, os resultados de ambos os métodos foram comparados estatisticamente com a aplicação do teste- $t$  pareado com um nível de confiança de 95%, obtendo-se um valor

experimental de  $t$  ( $t_{\text{experimental}} = 0,87$ ) inferior ao valor tabelado ( $t_{\text{tabelado}} = 4,3$ ), indicando assim a equivalência estatística dos resultados. Este conjunto de resultados comprova que o método proposto é exato e preciso para a determinação de EU em amostras de óleo de cravo, podendo futuramente ser aplicado em outros tipos de amostras. Embora sejam conhecidos os problemas de saúde que o EU pode causar, para produtos de cosméticos e de cuidados pessoais a legislação brasileira (ANVISA) não estabelece um limite máximo permitido para sua utilização. No entanto, a legislação exige apenas a identificação da concentração de EU nos rótulos dos produtos que exceder 0,001% (produtos sem enxague) e 0,01% (produtos com enxágue) (ANVISA, 2012).

### 5.3. PARTE 3 – Determinação de chumbo

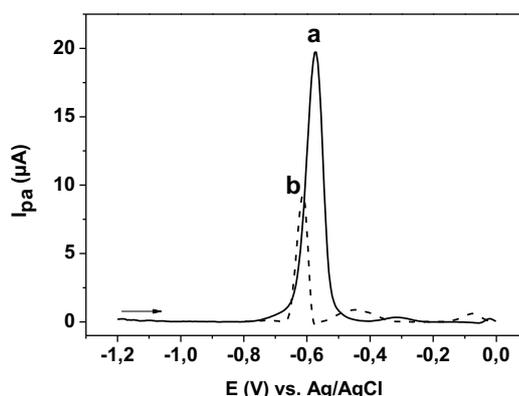
#### 5.3.1. Otimização das condições experimentais

##### 5.3.1.1. Seleção do eletrodo

Inicialmente foram avaliados o efeito da composição (tipo de aglutinante e condutor) e o modo de preparação da pasta (com e sem aquecimento da parafina no procedimento de homogeneização), contendo proporções fixas de aglutinante (20% *m/m*) e condutor (80% *m/m*), em relação à resposta voltamétrica de Pb imobilizado. Cabe salientar que para esta avaliação foram imobilizados 6,4  $\mu\text{g}$  de padrão de Pb na superfície da pasta ( $n=3$ ).

Quanto à seleção do aglutinante foram feitos estudos utilizando parafina e óleo mineral (seção 4.4.3). Este parâmetro é importante ser avaliado, pois o aglutinante tem como principal função dar consistência a pasta, fixando-a melhor ao eletrodo (WANG, 2000). Na Figura 30 são apresentados os voltamogramas de Pb imobilizado obtidos a partir das pastas de carbono contendo parafina (a) e óleo mineral (b).

**Figura 30.** Voltamogramas de pulso diferencial de Pb imobilizado obtidos para as pastas de carbono contendo parafina (a) e óleo mineral (b) em CB na presença de 6,4  $\mu\text{g}$  de Pb imobilizado. Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : 0 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ : 10 mV s<sup>-1</sup>.

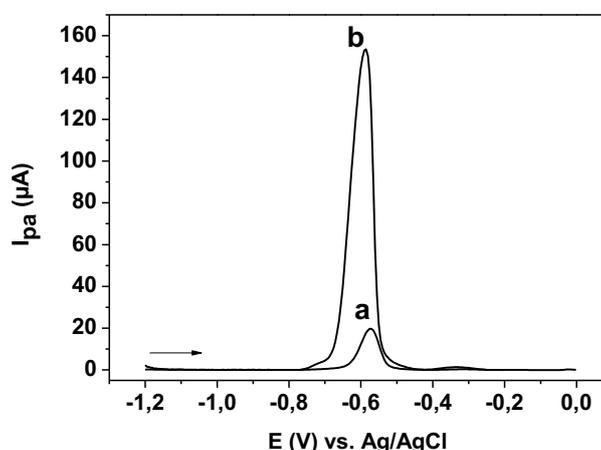


Como pode ser observado na Figura 30, a resposta de corrente anódica para o Pb imobilizado na pasta de carbono contendo parafina como aglutinante apresentou uma corrente ( $19,8 \pm 0,8 \mu\text{A}$ ) aproximadamente 2,1 vezes maior que a obtida com o

óleo mineral ( $9,5 \pm 0,7 \mu\text{A}$ ). Acredita-se que a eficiência da parafina está atribuída ao melhor preenchimento dos interstícios das partículas do condutor, pois na temperatura ambiente encontra-se em estado sólido. Sendo assim, foi selecionada a parafina para os experimentos subsequentes.

Após a seleção do melhor aglutinante, foram realizados experimentos para a obtenção do melhor procedimento de preparação da pasta. Este estudo foi desenvolvido com intuito de obter uma pasta mais homogênea garantindo uma superfície apropriada para a imobilização de Pb. Para isso, foi aquecido o gral antes da maceração e durante a maceração (procedimentos 1 e 2 da seção 4.1.3, respectivamente). Na Figura 31 estão demonstrados os voltamogramas para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado nas superfícies das pastas obtidas pelos procedimentos 1 (a) e 2 (b).

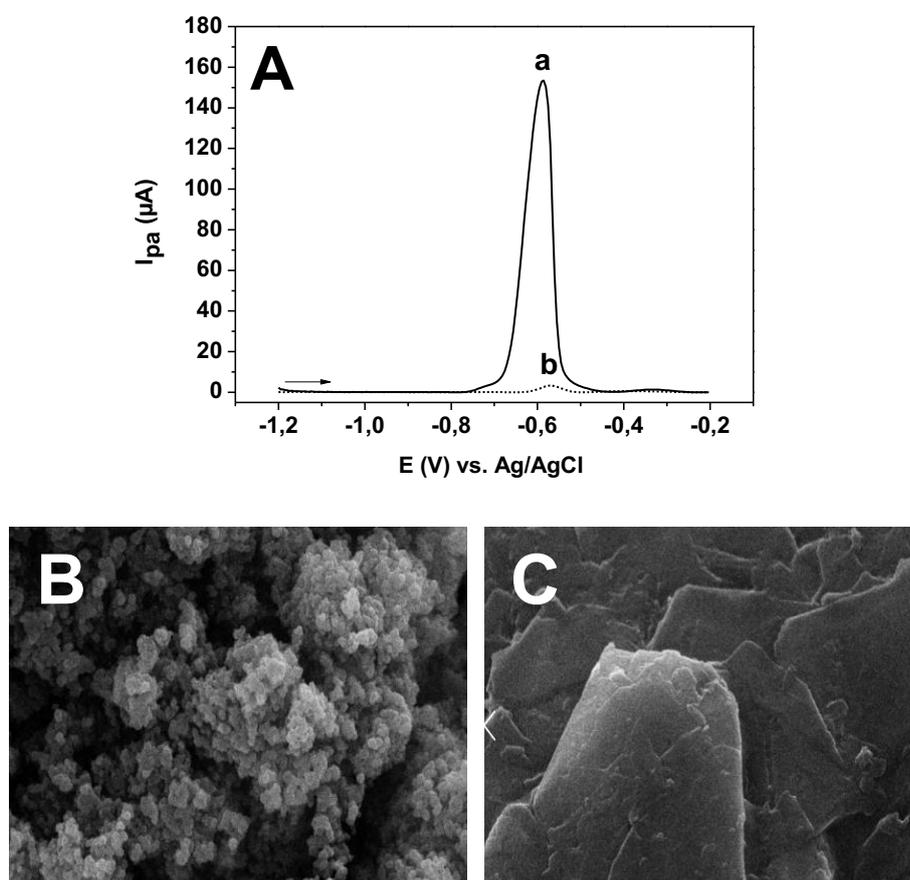
**Figura 31.** Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado utilizando os procedimentos 1 (a) e 2 (b). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ :  $-1,2 \text{ V}$ ;  $E_{\text{final}}$ :  $0 \text{ V}$ ; amplitude:  $25 \text{ mV}$ ;  $t_m$ :  $0,05 \text{ s}$  e  $v$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



Como pode ser visualizado, utilizando-se a segunda estratégia (procedimento 2) foi obtido um pico de corrente anódica ( $154 \pm 7,8 \mu\text{A}$ ) 8 vezes superior ao obtido utilizando a primeira estratégia ( $19,8 \pm 0,8 \mu\text{A}$ ). Essa maior corrente pode estar relacionada à melhor homogeneidade da pasta, uma vez que durante o processo de maceração a temperatura da mistura (CB + parafina) foi mantida constante (aproximadamente a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

A avaliação da influência dos condutores da pasta na resposta voltamétrica de Pb imobilizado foi realizada utilizando-se pó de grafite e CB. Ambos os materiais avaliados neste trabalho foram escolhidos por serem amplamente aplicados em estudos dedicados ao desenvolvimento de novos sensores por apresentarem excelentes características como, grande área superficial, boa estabilidade química, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e de impurezas eletroativas, boa condutividade elétrica, bem como, uma ampla faixa de potencial (MCCREERY, 2008). Na Figura 32 estão demonstrados os voltamogramas (A) com pasta de CB (a) e pó de grafite (b), assim como as micrografias eletrônicas de varredura das pastas contendo o CB (B) e pó de grafite (C).

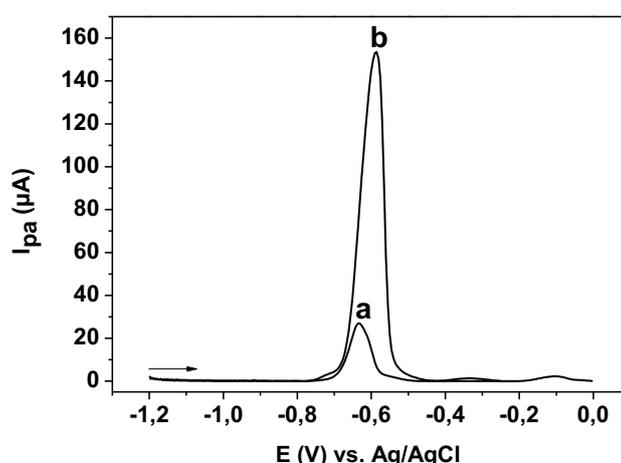
**Figura 32.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial para 6,4  $\mu\text{g}$  de Pb imobilizado em pasta de CB (a) e pó de grafite (b). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,2 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $v$ : 10 mV s<sup>-1</sup>. Imagens de MEV das pastas de (B) CB e (C) pó de grafite.



Como pode ser observada na Figura 32A, dentre os condutores avaliados, em CB o sinal analítico referente ao Pb imobilizado ( $154 \pm 7,8 \mu\text{A}$ ) foi aproximadamente 66 vezes maior quando comparado quando utilizando-se pó de grafite ( $2,3 \pm 0,2 \mu\text{A}$ ). Na Figura 32B é possível observar que a combinação de CB com a parafina apresentou uma pasta com superfície bastante homogênea, uniforme e com maior área superficial quando comparada a pasta composta por pó de grafite (Figura 32C). Com base nos resultados obtidos, o CB foi selecionado para os próximos estudos por apresentar morfologia mais adequada microscopicamente e maior capacidade condutora, uma vez que com essa superfície obteve-se maior resposta de corrente para o Pb imobilizado.

Adicionalmente, avaliou-se também a influência do DHP na resposta eletroquímica do Pb imobilizado sobre a superfície da pasta, visto que na literatura a combinação de nanomateriais eletroativos com o DHP é usualmente utilizado para melhorar a aderência do filme em substratos de carbono vítreo (JANEGITZ et al., 2015). Na Figura 33 são apresentados os voltamogramas de DPV para o Pb na presença e ausência do filme de DHP.

**Figura 33.** Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado na presença (a) e ausência de DHP (b) Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ :  $-1,2 \text{ V}$ ;  $E_{\text{final}}$ :  $0 \text{ V}$ ; amplitude:  $25 \text{ mV}$ ;  $t_m$ :  $0,05 \text{ s}$  e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

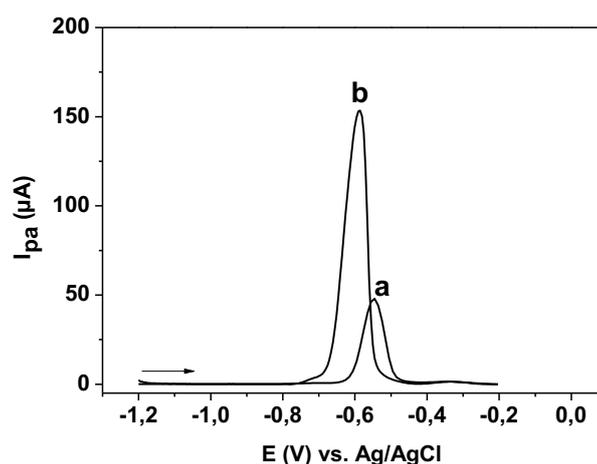


Como pode ser observado na Figura 33, as respostas de correntes de Pb obtidas na presença e ausência do filme de DHP foram de  $33,1 \pm 1,8 \mu\text{A}$  e

$154 \pm 7,8 \mu\text{A}$ , respectivamente. A diminuição de corrente em presença do filme de DHP pode ser justificada pela diminuição da área condutora através da película formada sobre a superfície do eletrodo condutor (partículas de CB) e, sendo assim, a imobilização sem a presença de DPH é mais indicada e foi utilizada nos experimentos a seguir.

O último teste em relação à escolha do melhor eletrodo (substrato) foi realizado através da comparação da imobilização em CPE e GCE e os resultados são apresentados na Figura 34.

**Figura 34.** Voltamogramas de pulso diferencial para  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado no GCE (a) e no CPE (b). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ :  $-1,2 \text{ V}$ ;  $E_{\text{final}}$ :  $-0,2 \text{ V}$ ; amplitude:  $25 \text{ mV}$ ;  $t_m$ :  $0,05 \text{ s}$  e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

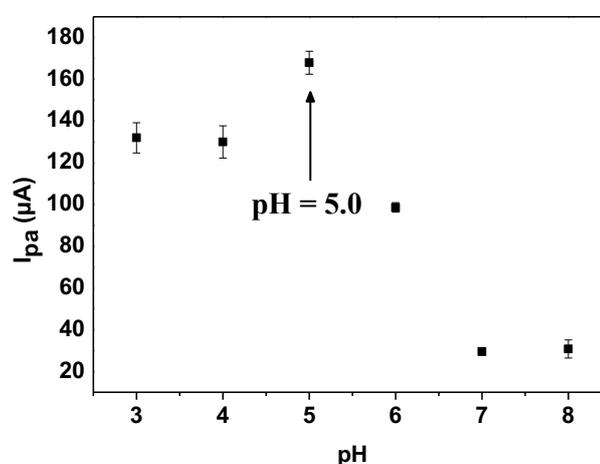


Tanto os eletrodos de CPE quanto os GCE podem ser utilizados como substrato para modificação (WANG, 2000). As respostas de correntes de Pb (Figura 34) obtidas no CPE e no GCE foram de  $154 \pm 7,8 \mu\text{A}$  e  $46 \pm 6,6 \mu\text{A}$ , respectivamente. A menor corrente obtida no GCE e o alto RSD (15%), pode ser justificado pela baixa aderência do padrão de Pb à superfície do GCE. Por outro lado, uma boa aderência na superfície do CPE e estabilidade (RSD  $< 5,1\%$ ) foram observadas no decorrer deste estudo. Esse comportamento pode ser justificado pelas propriedades físicas e químicas do CB como elevada área superficial, excelente condutividade elétrica e térmica (ARDUINI *et al.*, 2011; ARDUINI *et al.*, 2012; SILVA e FATIBELLO-FILHO, 2017; SILVA *et al.*, 2017). Sendo assim, a imobilização de Pb sobre a superfície do CPE é mais indicada e foi utilizada nos experimentos a seguir.

### 5.3.1.2. Avaliação do efeito do pH

Após a seleção do eletrodo a influência do pH (3 a 8) foi avaliada e os resultados estão demonstrados na Figura 35 através da representação da variação da  $I_{pa}$  em função do pH.

**Figura 35.** Efeito do pH sobre a resposta voltamétrica de 6,4  $\mu\text{g}$  de Pb imobilizado. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>,  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,2 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ : 10 mV s<sup>-1</sup>.

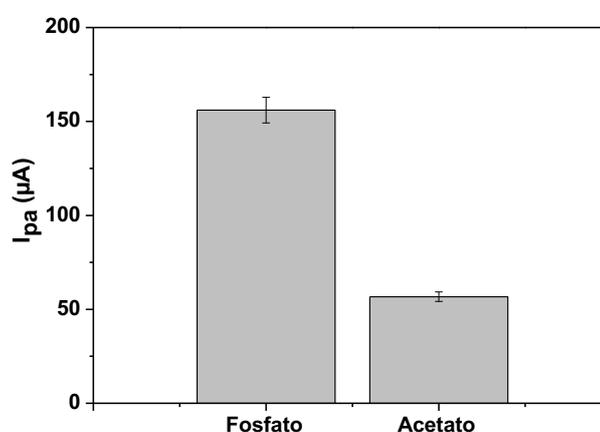


Conforme a Figura 35, é possível visualizar um aumento da corrente em pH 5 e para valores acima observa-se uma diminuição de corrente indicando que o pH influencia diretamente na oxidação do Pb. Este comportamento pode ser justificado devido às interações eletrostáticas entre os íons de  $\text{Pb}^{2+}$  e a superfície da pasta, uma vez que em meio protonado a transferência de elétrons é mais acentuada, favorecendo desta forma o processo de oxidação de Pb, o que está de acordo com alguns trabalhos da literatura (BOUWE *et al.*, 2011; VICENTINI *et al.*, 2014). Em valores superiores a pH 5, a resposta de corrente de Pb começa a diminuir, provavelmente devido a competição dos íons  $\text{OH}^-$ , formando  $\text{Pb}(\text{OH})_2$  na interface da camada difusional devido as reações de hidrólise (BOUWE *et al.*, 2011) prejudicando assim, a transferência de elétrons e troca de íons. Conforme observado na Figura 35, a maior resposta de corrente foi obtida em pH 5, sendo este selecionado para os próximos estudos.

### 5.3.1.3. Avaliação do efeito da composição e concentração do eletrólito

Para avaliar o efeito do eletrólito suporte na resposta voltamétrica de Pb, foram utilizadas as soluções de tampão acetato e fosfato, ambas com concentração de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 5 e os resultados são apresentados na Figura 36.

**Figura 36.** Gráfico do efeito do eletrólito suporte sobre a resposta voltamétrica de  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado no eletrodo modificado ( $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$ ). Condições experimentais DPV: 15 mL de eletrólito suporte (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ :  $-1,2 \text{ V}$ ;  $E_{\text{final}}$ :  $-0,4 \text{ V}$ ; amplitude:  $25 \text{ mV}$ ;  $t_m$ :  $0,05 \text{ s}$  e  $\nu$ :  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



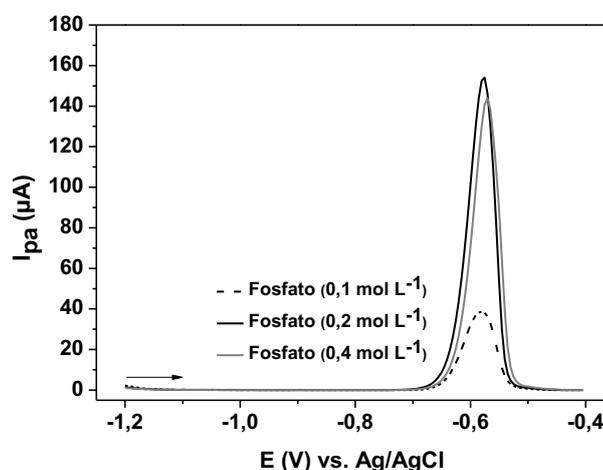
A partir dos valores de corrente de pico obtidos para a oxidação de Pb nos diferentes eletrólitos, pode-se concluir que o tampão fosfato proporcionou uma resposta analítica ( $154 \pm 7,8 \mu\text{A}$ ) 2,7 vezes superior ao valor de corrente obtida para o tampão acetato ( $56,7 \pm 2,5 \mu\text{A}$ ). Essa maior corrente obtida na presença de fosfato pode ser justificado pela tendência dessas espécies em formar complexos estáveis, através dos valores das constantes de estabilidade ( $\log K$ ) de 15,48 e 21,07 para  $\text{PbHPO}_4$  e  $\text{PbH}_2\text{PO}_4^+$ , respectivamente (SMITH e MARTELL, 1989) favorecendo desta forma, a troca iônica entre a fase II e a fase III do sistema eletrodo de três fases. Já as espécies de acetato possuem valores menores para o  $\log K$  de 2,15 para  $\text{Pb}(\text{Ac})^+$  e 3,18 para  $\text{Pb}(\text{Ac})_2$  (SMITH e MARTELL, 1989) o que pode minimizar a troca iônica e conseqüentemente resultar em uma diminuição da resposta voltamétrica.

Levando em conta o propósito analítico deste trabalho, foi selecionado o tampão fosfato como eletrólito suporte, uma vez que a obtenção de correntes mais altas pode

levar a determinações eletroanalíticas como maior sensibilidade e menor limite de detecção.

Avaliou-se também o efeito da concentração do tampão fosfato em relação à resposta analítica de Pb imobilizado e os resultados estão demonstrados na Figura 37.

**Figura 37.** Voltamogramas de pulso diferencial para 6,4  $\mu\text{g}$  de Pb imobilizado utilizando o tampão fosfato 0,1; 0,2 e 0,4  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 5). Condições experimentais DPV: 15 mL de eletrólito suporte,  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,4 V; amplitude: 25 mV;  $t_m$ : 0,05 s e  $\nu$ : 10  $\text{mV s}^{-1}$ .



Foi possível observar que em concentrações maiores de eletrólito a corrente de pico obtida foi maior. Os valores de correntes de Pb obtidos em meio de tampão fosfato 0,1, 0,2 e 0,4  $\text{mol L}^{-1}$  foram  $37 \pm 2$ ,  $158 \pm 6$  e  $144 \pm 1$   $\mu\text{A}$ , respectivamente. Apesar da oxidação de Pb imobilizado apresentaram maior magnitude de corrente em 0,2 e 0,4  $\text{mol L}^{-1}$ , os resultados indicam que não há diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,08$ ) entre essas duas concentrações, em um intervalo de confiança de 95%. Deste modo, 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  foi selecionado para os demais experimentos.

### 5.3.2. Avaliação dos parâmetros DPV

Os parâmetros experimentais da DPV foram otimizados utilizando o eletrodo  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  contendo 6,4  $\mu\text{g}$  de Pb imobilizado em tampão fosfato 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 5).

**Tabela 8.** Parâmetros experimentais DPV investigados e valores selecionados.

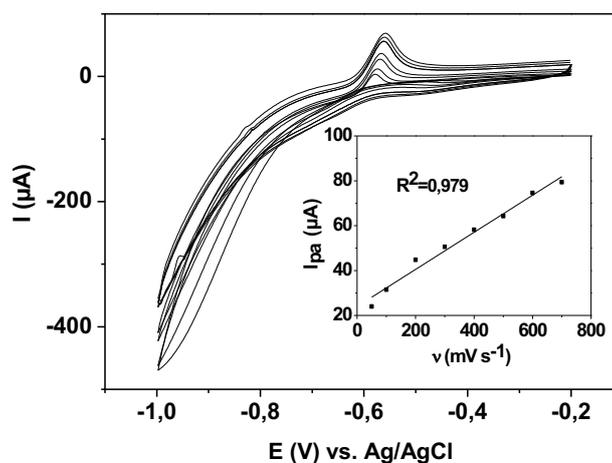
Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ )	2,5 - 10	10
Amplitude (mV)	25 - 100	70
Tempo de modulação (ms)	10 - 50	20

A seleção dos valores para cada parâmetro foi feita, levando em consideração a maior magnitude de corrente anódica ( $I_{pa}$ ) e melhor resolução do sinal analítico. Os intervalos estudados e os respectivos valores selecionados estão demonstrados na Tabela 8. Desta forma, os valores de velocidade de varredura, amplitude e tempo de modulação selecionados foram  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , 70 mV e 20 ms, respectivamente.

### 5.3.3. Avaliação da resposta eletroquímica do Pb imobilizado

A cinética reacional do Pb quando imobilizado na superfície do eletrodo  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  foi investigado por CV em tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5) e os resultados estão demonstrados na Figura 38.

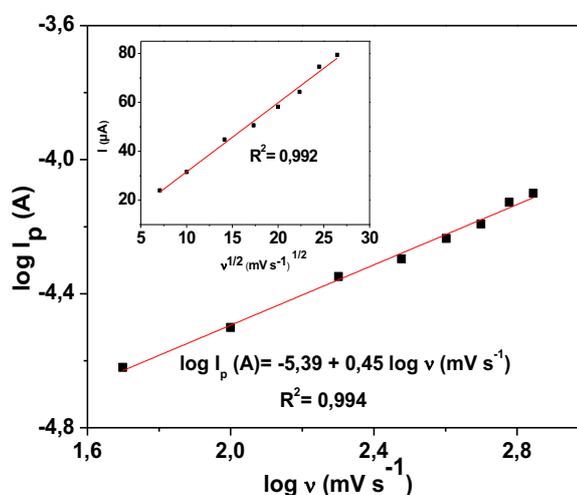
**Figura 38.** Voltamogramas cíclicos de  $6,4 \mu\text{g}$  de Pb imobilizado em 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e  $700 \text{ mV s}^{-1}$  (Inset a relação entre  $I_{pa}$  ( $\mu\text{A}$ ) vs  $v$  ( $\text{mV s}^{-1}$ )). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ :  $-1,0 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}}$ :  $-0,2 \text{ V}$ .



Como pode ser observado, o Pb apresenta apenas um pico de oxidação em um potencial de  $-0,58$  V (Figura 38), indicando um comportamento eletroquímico irreversível no eletrodo proposto.

Os voltamogramas cíclicos registrados na Figura 38 mostram um aumento e um pequeno deslocamento do pico anódico, à medida que a velocidade de varredura aumenta. Observa-se uma relação linear da corrente anódica com o aumento da velocidade de varredura ( $v$ ) (*inset* Figura 38), obtendo-se um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,979 indicando que o processo é controlado por adsorção (BRETT e BRETT, 1993). Adicionalmente, as relações entre  $I_{pa}$  versus  $v^{1/2}$  (50 a 700  $\text{mV s}^{-1}$ ) e  $\log I_{pa}$  vs  $\log v$  (50 a 700  $\text{mV s}^{-1}$ ) também foram avaliadas e os resultados estão apresentados na Figura 39.

**Figura 39.** Gráfico  $\log I_{pa}$  vs  $\log v$  ( $\text{mV s}^{-1}$ ). Condições experimentais: 15 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ :  $-1,0$  V e  $E_{\text{final}}$ :  $-0,2$  V. *Inset*: relação entre a  $I_{pa}$  vs  $v^{1/2}$ .



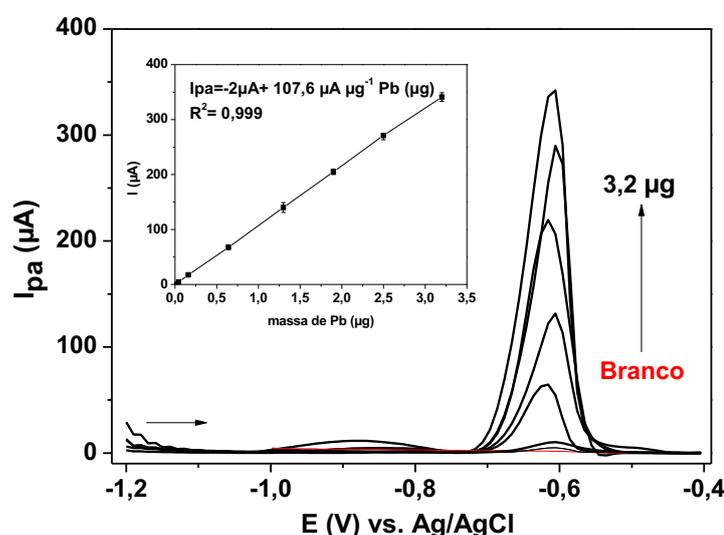
A relação entre  $I_{pa}$  versus  $v^{1/2}$  (50 a 700  $\text{mV s}^{-1}$ ) apresentou uma relação linear com  $R^2$  de 0,992 indicando que o processo é controlado por difusão (BRETT e BRETT, 1993). Uma vez que, as avaliações anteriores não são conclusivas em relação à cinética reacional, avaliou-se a relação entre  $\log I_{pa}$  vs  $\log v$  e como pode ser observado na Figura 39, o coeficiente angular obtido na regressão foi de 0,45. Este valor está próximo do valor teórico (0,5) para sistemas controlados por difusão (BRETT

e BRETT, 1993) e, sendo assim, pode-se afirmar que a cinética reacional é controlada por difusão.

#### 5.3.4. Avaliação do desempenho analítico

Após a otimização dos parâmetros experimentais, o desempenho analítico do método utilizando a DPV para a determinação de Pb foi avaliado. Um dos parâmetros avaliados foi a faixa linear utilizando-se a calibração externa através da imobilização de diferentes massas de Pb (0,042 a 3,2  $\mu\text{g}$ ) na superfície dos CPE e os resultados estão demonstrados na Figura 40.

**Figura 40.** Voltamogramas de DPV contendo diferentes massas de Pb imobilizado (0,042, 0,16, 0,64, 1,3, 1,9, 2,5 e 3,2  $\mu\text{g}$ ) no  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$ . *Inset:* curva analítica ( $I_{\text{pa}}$  versus massa de Pb). Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,4 V; amplitude: 70 mV;  $t_m$ : 0,02 s e  $\nu$ : 10  $\text{mV s}^{-1}$ .



Pode-se perceber que a corrente de pico anódica aumenta linearmente com a massa de Pb imobilizado. A equação da regressão linear e o coeficiente de determinação obtidos para a curva analítica foram  $I_{\text{pa}} (\mu\text{A}) = -2 \mu\text{A} + 107,6 \mu\text{A } \mu\text{g}^{-1} \text{ Pb } (\mu\text{g})$  e  $R^2 = 0,999$ , respectivamente. A partir da curva de calibração externa, calculou-se o LOD e LOQ e os valores obtidos foram de 4 e 13 ng, respectivamente. Esses valores estão abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação para a concentração de

acetato de chumbo (0,6 %) em tinturas capilares (corresponde uma massa de 0,0038 g de Pb) (ANVISA, 2013).

Os resultados utilizando o método proposto foram comparados com outros trabalhos encontrados na literatura que aplicam técnicas voltamétricas para a determinação de Pb utilizando diferentes eletrodos de trabalho e os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

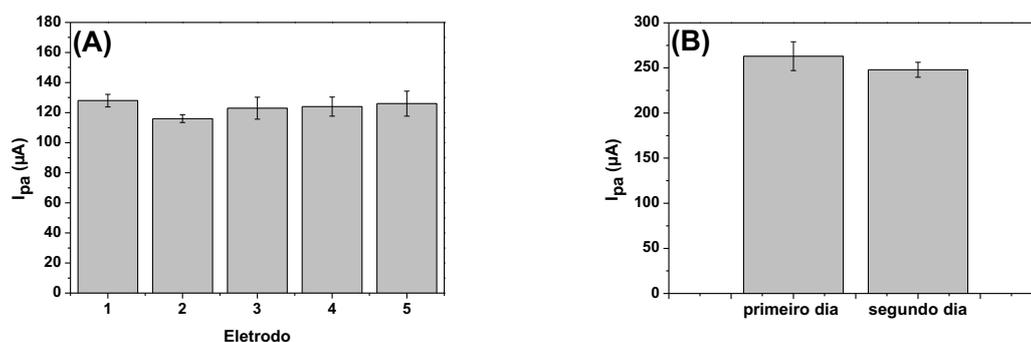
**Tabela 9.** Comparação entre os valores de LOD obtidos para o método voltamétrico proposto utilizando o  $Pb_{(imob.)}$ / CPE e para outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura.

Eletrodo	Técnica	LOD	Referência
GCE modificado (MWCNT-EBP-NA/ GCE)	ASDPV	0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$	ZHAO <i>et al.</i> , 2016
GCE modificado (MWCNTs)	SWASV	0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$	LI <i>et al.</i> , 2016
GCE modificado (Au-GN-Cys)/ Bi	SWASV	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$	ZHU <i>et al.</i> , 2014
GCE modificado MWCNT's/poly (PCV)/Bi	ASDPV	0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$	CHAMJANGALI <i>et al.</i> , 2015
$Pb_{(imob.)}$ / CPE	DPV	4 $\text{ng L}^{-1}$	Proposto

Pode-se observar na Tabela 9 que o eletrodo proposto apresentou melhor resposta em termos de limite de detecção em comparação aos métodos reportados na literatura para a determinação de Pb. Cabe salientar que nos trabalhos publicados na literatura que utilizam métodos eletroanalíticos para a determinação de Pb, não há menção dos valores de LOD em relação massa imobilizada do analito na superfície do eletrodo, mas sim da concentração do analito em solução.

Para o estudo da repetibilidade intra-dia, cujos resultados estão apresentados na Figura 41A é possível observar uma pequena diferença de corrente ( $RSD < 4\%$ ) entre os 5 eletrodos imobilizados com 1,3  $\mu\text{g}$  de Pb.

**Figura 41.** (A) Avaliação da repetibilidade intra-dia do  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  contendo 1,3  $\mu\text{g}$  de Pb imobilizado (B) avaliação da repetibilidade inter-dia do  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  contendo 2,5  $\mu\text{g}$  de chumbo imobilizado. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,4 V; amplitude: 70 mV;  $t_m$ : 0,02 s e  $\nu$ : 10  $\text{mV s}^{-1}$ .



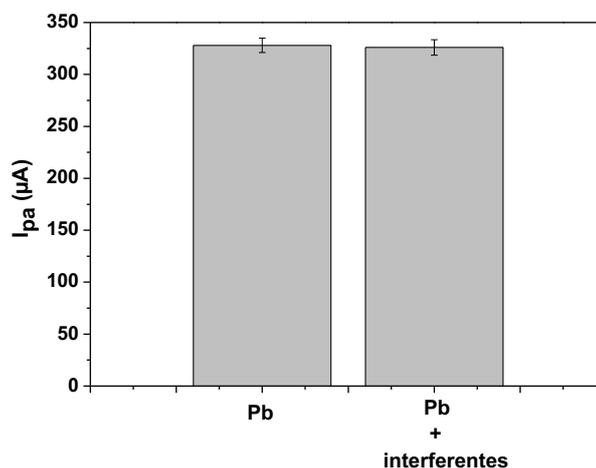
Os valores de corrente do pico anódico monitorados entre 2 dias (Figura 41B), também apresentaram um desvio padrão relativo inferior a 4%. Com isso podemos concluir que os resultados obtidos nos estudos da repetibilidade intra e inter-dia, exibiram boa precisão e boa estabilidade de resposta do Pb imobilizado no eletrodo proposto.

A estabilidade de resposta do  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  foi avaliada de 2 maneiras, sendo a primeira avaliação feita através de 50 ciclos a uma velocidade de varredura constante ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) e a segunda através de 30 sucessivas medições feitas por DPV sob as condições otimizadas anteriormente. Neste estudo foi imobilizado 2,5  $\mu\text{g}$  de Pb sobre a superfície do  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  e os valores de RSD para os 50 voltamogramas cíclicos e 30 sucessivas medições utilizando a DPV foram de 6,5% e 5,5%, respectivamente, demonstrando a alta estabilidade da resposta do Pb imobilizado no eletrodo proposto.

### 5.3.5. Estudo de interferente

A possível interferência do cloreto de amônio e do propilenoglicol (compostos presentes em todas as amostras de tinturas capilares analisadas neste trabalho) foram investigados. Para avaliar o efeito destes compostos, 3,2  $\mu\text{g}$  de Pb foi imobilizada e sua resposta voltamétrica foi analisada na ausência e na presença de 3,2  $\mu\text{g}$  de cada possível interferente e os resultados estão demonstrados na Figura 42.

**Figura 42.** Influência do cloreto de amônio e do propilenoglicol na resposta de corrente anódica de 3,2  $\mu\text{g}$  de Pb immobilizado. Condições experimentais DPV: 15 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 5),  $E_{\text{inicial}}$ : -1,2 V;  $E_{\text{final}}$ : -0,4 V; amplitude: 70 mV;  $t_m$ : 0,02 s e  $\nu$ : 10 mV s<sup>-1</sup>.



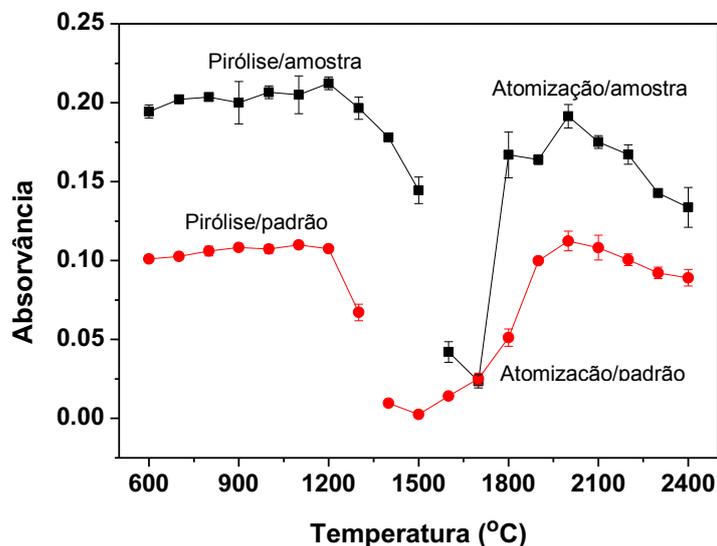
Como pode ser observado (Figura 42) as respostas de corrente anódica registradas na presença do cloreto de amônio e propilenoglicol não apresentaram influencia significativa ( $p = 0,09$ , com um nível de confiança de 95%) na resposta voltamétrica de Pb.

### 5.3.6. Determinação de Pb em amostras de tintas de cabelo

A aplicabilidade do método proposto foi avaliada por meio da determinação de Pb em três amostras de tinturas capilares ( $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ ) através da imobilização de 10  $\mu\text{g}$  de amostra (Figura 5, seção 4.5.3) na superfície do  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$ .

Para avaliar o desempenho do método proposto empregando o  $\text{Pb}_{(\text{imob.})}/\text{CPE}$  combinado com a VIM utilizou-se como método comparativo a Absorção Atômica (condições experimentais descritas na seção 4.3). A otimização das temperaturas foi feita fixando-se a temperatura de atomização em 1500 °C para o estudo da temperatura de pirólise (600 a 1300 °C), enquanto que para o estudo da temperatura de atomização (1400 a 2400 °C) foi fixada a temperatura de pirólise que se obteve maior sinal de absorbância e os resultados da otimização estão demonstrados na Figura 43.

**Figura 43.** Gráfico das curvas de temperaturas de pirólise e atomização com  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb,  $5 \mu\text{L}$  da solução do modificador químico  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em meio aquoso e na amostra ( $T_1$ ).



Como pode ser observado no gráfico da Figura 43, a partir das curvas de pirólises, no padrão de Pb em meio aquoso e na amostra digerida em meio ácido, foi possível observar que a intensidade de sinal em absorvância se mantém constante até 1200 °C e em valores maiores começa a diminuir. Na faixa de 600 °C a 1200 °C, as absorvâncias não apresentaram diferença significativa (teste de *Tukey-Kramer*). Dessa forma, a temperatura de pirólise de 1000 °C foi escolhida, pois apresentou comportamento térmico semelhante tanto em meio aquoso quanto na amostra com menores RSDs (<1,97%) quando comparado às demais temperaturas. Para a atomização foi escolhida a temperatura de 2000 °C por apresentar a maior intensidade de sinal de absorvância em comparação com as outras temperaturas, tanto para a amostra quanto para a solução padrão. Levando em consideração o mesmo comportamento térmico obtido entre a amostra e a solução padrão a calibração foi feita no padrão de Pb em meio aquoso.

A avaliação das temperaturas de pirólise e atomização feitas na amostra e no padrão aquoso de Pb foi importante, pois através desse estudo foi possível avaliar o comportamento térmico do Pb em ambos os meios, a fim obter uma condição com maior intensidade de sinal e menor RSD. Além disso, a utilização do modificador químico foi importante, pois torna o analito menos volátil, possibilitando uma separação

térmica mais eficiente dos concomitantes da matriz da amostra, antes da atomização (TSALEV *et al.*, 2000).

As condições utilizadas para a análise de Pb por Absorção Atômica são apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10.** Programação utilizada para a determinação de Pb por HR-CS GF AAS.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Tempo (s)	Ar (L min <sup>-1</sup> )
Secagem 1	90	3	20	2,0
Secagem 2	110	5	20	2,0
Pirólise	1000	300	15	2,0
Auto-zero	1000	0	5	0
Atomização	2000	1500	4	0
Limpeza	2450	500	4	2,0

Os resultados obtidos das concentrações de Pb nas diferentes tinturas capilares por VIM e Absorção Atômica estão demonstrados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Valores de Pb quantificados em amostras de tinturas capilares (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>), pelos métodos voltamétrico proposto (P) e comparativo (C) (n=3)

Amostra	Concentração de Pb (%)		E (%)
	Método comparativo	Método proposto	
T <sub>1</sub>	0,37 ± 0,02	0,36 ± 0,01	2,7
T <sub>2</sub>	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,01	7,7
T <sub>3</sub>	< LOD	< LOD	-

$$n=3, E=100 \times (P - C) / C$$

Como pode ser observado, as concentrações quantificadas por VIM nas amostras T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> (0,36 e 0,14%, respectivamente) estão dentro do preconizado pela ANVISA que estabelece limite máximo para acetato de chumbo (0,6%) ou seja 0,38% de Pb (ANVISA, 2013). Na amostra T<sub>3</sub> o analito não foi detectado. Comparando os resultados apresentados, foram obtidos valores de erro relativo entre 2,7 e 7,7%, demonstrando uma excelente concordância dos dados obtidos por ambos os métodos.

As concentrações de Pb obtidas utilizando a técnica espectrométrica foram concordantes ( $t_{\text{experimental}} = 3,6$  inferior ao valor tabelado  $t_{\text{tabelado}} = 4,3$ ) com os valores obtidos utilizando o método proposto confirmando assim a precisão do método desenvolvido. Estes resultados indicam que não houve diferença significativa, a um nível de confiança de 95%, estando os erros dentro de um intervalo aceitável (RODRIGUES, 2014).

O método proposto mostrou-se bastante interessante, podendo ser aplicado nas amostras de tintura, sem requerer etapas demoradas para a preparação da amostra e sim apenas uma simples diluição, além de apresentar custo relativamente baixo e facilidade de preparação do eletrodo, não necessitando de reagentes e instrumentação dispendiosa quando comparado aos demais métodos empregados na literatura. Além disso, a execução do procedimento de imobilização da amostra é feita de forma simples e rápida, sendo uma alternativa para o monitoramento de Pb em amostras de tinturas capilares.

Tendo em vista que as tintas analisadas neste trabalho são oferecidas ao consumidor em diversos estabelecimentos comerciais e consumidas por pessoas de diferentes faixas etárias, o monitoramento de Pb é pertinente, uma vez que quando entra no organismo humano pode levar a uma série de problemas hormonais, gastrointestinais, musculares, até mesmo o surgimento de câncer, entre outros (VICENTINI *et al.*, 2014).

## 6. CONCLUSÕES

---

---

Um novo avanço na área de química analítica utilizando a técnica de VIM foi relatado neste trabalho. Três novos eletrodos foram desenvolvidos, utilizando a VIM combinada à imobilização por *drop coating* e os métodos propostos proporcionaram um aumento da resposta analítica e baixos limites de detecção.

Como condutor, o CB apresentou os melhores resultados no desempenho eletroquímico e analítico e esse comportamento pode ser atribuído à sua boa estabilidade química, excelente condutividade elétrica e grande área superficial. A associação de um polímero (aderente) ao CB resultou em um filme condutor com excelente aderência em substratos de carbono vítreo, assim como boa resposta quando utilizado no desenvolvimento do CPE, garantindo assim uma alta robustez para os eletrodos modificados desenvolvidos.

Na preparação dos eletrodos uma pequena quantidade de amostra foi imobilizada e características como simplicidade na preparação, resposta rápida, custo relativamente baixo, alta sensibilidade e seletividade, além de baixo consumo de solventes se destacam quando comparado a outros métodos analíticos. Adicionalmente, os métodos desenvolvidos neste trabalho apresentaram resultados satisfatórios em termos de linearidade, precisão e exatidão evidenciando a viabilidade da aplicação dos eletrodos modificados propostos.

O  $HQ_{(imob.)}$ -CB-CTS-ECH/GCE foi utilizado para análise de HQ em cremes dermatológicos por VIM e os resultados obtidos foram concordantes com os determinados pelo método comparativo (UV-Vis).

Quando se utilizou o eletrodo modificado  $EU_{(imob.)}$ -CB-DHP/GCE para determinação de EU em amostras de óleos de cravo e comparou-se os resultados com o método comparativo (espectrofotométrico), valores de erro relativo de 0,08 a 3,54% foram obtidos, demonstrando assim a concordância dos resultados por ambos os métodos. A utilização do  $Pb_{(imob.)}$ /ECP também forneceu resultados concordantes com o método comparativo (Absorção Atômica) sendo que valores de erro relativo de 2,7 a 7,7% foram obtidos, demonstrando também a concordância dos resultados por ambos os métodos.

Adicionalmente, foi observado que  $HQ_{(imob.)-CB-CTS-ECH/GCE}$  o processo é controlado tanto por adsorção quanto por difusão. Já para os eletrodos modificados  $EU_{(imob.)-CB-DHP/GCE}$  e  $Pb_{(imob.)}/ECP$  os processos redox do EU e Pb são controlados por adsorção e difusão, respectivamente.

De modo geral, o desenvolvimento desse trabalho representa uma importante inovação demonstrando o potencial da VIM no cenário da química referente aos estudos eletroanalíticos de substâncias sólidas ou líquidas, solúveis ou pouco solúveis. Além disso, a inédita combinação da VIM com a imobilização adotada (*drop coating*) pode ser aplicada em estudos futuros, podendo servir como fonte para o desenvolvimento de outras pesquisas em diferentes matrizes, com novas perspectivas no âmbito da análise quantitativa e caracterizações de processos redox.

## 7. APÊNDICE

J Solid State Electrochem (2017) 21:2859–2868  
DOI 10.1007/s10008-017-3614-3



ORIGINAL PAPER

# A combination of voltammetry of immobilized microparticles and carbon black-based crosslinked chitosan films deposited on glassy carbon electrode for the quantification of hydroquinone in dermatologic cream samples

Juliana Villela Maciel<sup>1</sup> · Elson Luiz Fava<sup>2</sup> · Tiago Almeida Silva<sup>2</sup> · Daiane Dias<sup>1</sup> · Orlando Fatibello-Filho<sup>2</sup>

**Abstract** New progress in the application of voltammetry of immobilized microparticles (VIM) technique in electroanalytical chemistry is reported in this work through the determination of hydroquinone in dermatologic cream samples. The designed electrode was based on a glassy carbon electrode modified with a crosslinked chitosan film containing immobilized carbon black nanoparticles and hydroquinone standards or sample. The electrochemical features of immobilized hydroquinone were explored, which a fast electron transfer kinetic was verified from the perfect reversible redox behavior of this molecule. All the experimental conditions were optimized, including supporting electrolyte condition (composition, pH, and ionic strength) and technical parameters of differential pulse voltammetry (DPV). Under the optimized experimental conditions, the analytical curve was linear by a wide concentration range from 2.7 to 43 ng, with detection and quantification limits of 0.045 and 0.15 ng, respectively. Two commercial dermatologic cream samples were successfully immobilized and analyzed using the proposed VIM procedure, and the results were similar to those recorded by a spectrophotometric comparative procedure. Our set of results represents a unique and exciting advance in the scenario of electroanalytical chemistry for future applications.

**Keywords** Voltammetry of immobilized microparticles · Hydroquinone · Carbon black · Crosslinked chitosan · Dermatologic cream samples

## Introduction

It is well known and common that in electroanalysis, the analytical determinations occur involving current measurement in an applied potential, in order to conduct an oxidation and/or reduction process providing that the target molecule are dissolved in a conductive supporting electrolyte. Therefore, it is a two-phase system, where the electron transfer processes occur in the interface between the solid phase (e.g., solid electrode) and the liquid phase (supporting electrolyte containing the analyte solubilized) [1]. From a practical analytical viewpoint, for the analysis of solid matrices samples, a sample preparation from the dissolution of the solids is necessary, hampering their use in direct analysis when this solid is insoluble in the supporting electrolyte. Until the end of 1980s, the solid-state supporting electrolyte. Until the end of 1980s, the solid-state electrochemistry was studied only for production and energy storage (e.g., photovoltaic cells) and virtually no work was carried out in the electrochemical analysis field [2].

Scholz and co-workers reported the first study about direct analysis of solid-state materials using the electroanalytical techniques in 1989 [3], when they developed a sensor based on a solid analyte immobilized in paraffin-impregnated graphite electrode (PIGE). The studied materials were different lead-antimony alloys, and trace level mass (in order of  $10^{-8}$  g) was mechanically transferred onto electrode surface following anodic dissolution of metals using differential pulse voltammetry (DPV), providing information regarding the composition of these alloys. This technique was called at that

✉ Daiane Dias  
daianezd@gmail.com

<sup>1</sup> School of Chemical and Food, Federal University of Rio Grande, Av. Itália, km 8, P. O. Box 474, Rio Grande, RS 96203-900, Brazil

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luís km 235, P. O. Box 676, São Carlos, SP 13560-970, Brazil

time “adsorptive stripping analysis” and later “voltammetry of immobilized microparticles” (VIM) [4–7].

VIM may provide high analytical signals to very low quantities of immobilized microparticles. This feature is contrasted with “conventional” voltammetric methods, since the analytical signal is due to redox processes that occur in the double layer and therefore, a small part of analyte is dissolved in the supporting electrolyte solution. In these conventional approaches, low signals are measured (small current values) to low analyte concentration levels, affecting directly the detection and quantification limits. In the case of VIM, the obtained analytical signal is an average response of many particles immobilized onto electrode surface, providing a high response with a very small amount of analyte [2, 8].

There are many works using VIM for detection of organic compounds, such as herbal formulation and their adulterants [9, 10], organic dyes [11], pesticides [12], and others. Novak and co-workers [13] developed a method for cannabinoid detection in hemp samples using a PIGE, reporting low-cost analysis through the electrochemical oxidation of phenol group. In another study, the VIM was applied for plant taxonomic characterization where the electrochemical signals monitored were polyphenolic compounds from leaf extract microparticle films [14]. Jovanović and co-workers [15] studied pungency level of hot peppers by capsaicin detection using the cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry techniques immobilizing pepper samples on PIGE.

Although several works found in literature which use VIM are on qualitative or semi-quantitative analysis, articles addressing quantitative analysis have also been reported [16–26]. In this way, VIM can be used as an alternative analytical tool to replace other sophisticated methods of high cost and time analysis, which are normally dependent on complex sample pretreatment steps.

Chitosan (CTS) is a biopolymer widely used in electroanalytical in the development of modified electrodes, due to its characteristics of good adhesion on traditional electrochemical surfaces, high mechanical strength, and relatively low cost since it is a renewable resource [27–29]. Moreover, when the chitosan is crosslinked, it exhibits excellent adherence on glassy carbon substrates, which ensures a high robustness for the modified electrode [14].

In order to ensure a high electrochemical and analytical performance, it is clear the necessity of using a conductive material, not only to help the immobilization of solid sample but also to ease the electron and ion conduction. In this sense, the powdered carbon materials may be an option due to their known conductivity, low background current, and wide potential window [30, 31]. Among the carbon materials, carbon black stands out. This nanostructured material have several properties that make it interesting for electrochemical analysis (including VIM) beyond the aforementioned properties, such as high surface area, thermal and electrical stability, and a very

low cost, cheapening the cost of analysis. Due to these great properties, the carbon black has been used in electroanalytical chemistry as sensor and biosensor in a large number of works [32–34], including studies about phenolic compound determination such as hydroquinone [33].

The hydroquinone (1,4-dihydroxybenzene) is widely used in various applications such as biological, cosmetic, and industrial processes (dermatological cream, coal-tar production, paper manufacturing or in photographic developing) [35, 36]. This compound has been widely applied in the field of cosmetics to be a strong depigmentation agent having the main function of inhibiting melanin production [37]. Its use is indicated for skin whitening, effectively being in the range from 2 to 5% m/m [38, 39]. Otherwise, excess of hydroquinone can cause redness, burning, blood poisoning, nausea, abdominal pains, convulsion, and even coma [37]. Its monitoring is justified due to its high toxicity and low degradability in the environment, even at very low concentrations [40, 41]. According to Brazil’s National Health Surveillance Agency, the maximum permissible concentration of hydroquinone in skin care products is 2% m/m, but levels of handled products can reach up to 4% m/m [42]. On the other hand, studies and information on safe use of hydroquinone have been published by the Food and Drug Administration (FDA), indicating that hydroquinone may act as a cancer-causing agent (carcinogen), forcing many European countries to ban its use in order to minimize risks to public health [43]. Electroanalytical tools are featured as potential alternative methods to the sensing of hydroquinone [44–46].

Therefore, the aim of this research is to develop a simple and fast new method based on combination of VIM technique and carbon black-based crosslinked chitosan films to the immobilization of commercial dermatologic cream samples for the hydroquinone direct determination.

## Experimental

### Reagents and solutions

Hydroquinone (HQ), epichlorohydrin (ECH), chitosan (CTS, low molar mass and degree deacetylation of 80%), and 25% (m/v) glutaraldehyde (GA) aqueous solution were purchased from Sigma-Aldrich. NaOH, reagents for phosphate buffer ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) and KCl were acquired from Acros. The VXC72R carbon black (CB) was kindly supplied by Cabot Corporation. Graphite powder was acquired from Fisher Chemical. All other chemicals used were of analytical grade. The solutions were prepared using ultrapure water (resistivity  $>18.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtained from a Millipore Milli-Q system (Billerica, USA). The hydroquinone standard solution was prepared daily by dissolving 0.002 g of hydroquinone in 25 mL of ultrapure water at room

temperature ( $25 \pm 2$  °C). The CTS stock solution (1.0% *m/v*) was prepared by dissolving 1.0 g of CTS powder in 100 mL of 1.0% (*v/v*) acetic acid solution at room temperature and kept under constant stirring for 3 h until complete dissolution.

The ECH solution 1.0% (*v/v*) was obtained from dilution of 100  $\mu\text{L}$  of the 99% (*v/v*) stock solution in 10 mL of 0.01 mol  $\text{L}^{-1}$  NaOH solution.

CTS and ECH solution were stored at 4 °C in a refrigerator when not in use.

### Instrumentation

For the cleaning procedure of the glassy carbon electrode surface (GCE,  $\varnothing = 3$  mm) as well as for preparation of the carbon black dispersions, it was employed an ultrasonic bath UltraCleaner 1400 A from Unique Ultrasonic Systems (Indaiatuba, Brazil). The pH measurements were performed using an Orion Expandable Ion Analyzer (model EA-940, USA), employing a combined glass electrode with an Ag/AgCl (3.0 mol  $\text{L}^{-1}$  KCl) external reference electrode.

Electrochemical experiments were performed using a Potentiostat/Galvanostat Autolab PGSTAT204 (Metrohm-Autolab, Utrecht, Netherlands) controlled by the NOVA 2.0 software (Eco Chemie) fitted with an electrochemical cell containing three electrodes (15 mL) being the following: the working electrode, which was the GCE modified with a crosslinked chitosan film containing immobilized CB particles and the hydroquinone standard or sample, an Ag/AgCl (3.0 mol  $\text{L}^{-1}$  KCl) as the reference electrode, and a Pt foil as the auxiliary electrode.

CV and DPV measurements were performed in 0.2 mol  $\text{L}^{-1}$  phosphate buffer solution (pH = 5.0). The experimental conditions for DPV technique were start potential =  $-0.1$  V, end potential = 0.35 V, modulation amplitude = 80 mV, modulation time = 35 ms, and scan rate = 5  $\text{mV s}^{-1}$ . CV experiments were performed at scan rate of 50  $\text{mV s}^{-1}$ .

The measurements of the comparative method for hydroquinone determination (spectrophotometric method) [47] were carried out using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer with 1.0 cm quartz cell. The hydroquinone was determined at 293 nm using peak height.

### Preparation of the modified working electrode

Figure 1 shows a scheme of the steps followed for preparation and construction of the modified electrode. The GCE was modified with a crosslinked chitosan film containing conductive carbon black nanoparticles and microparticles of hydroquinone standard or sample.

Prior to the electrode modification, the GCE surface was carefully polished and rinsed with ultrapure water. Following, it was sonicated in isopropyl alcohol (2 min), with ultrapure water (2 min) and then dried at room temperature.

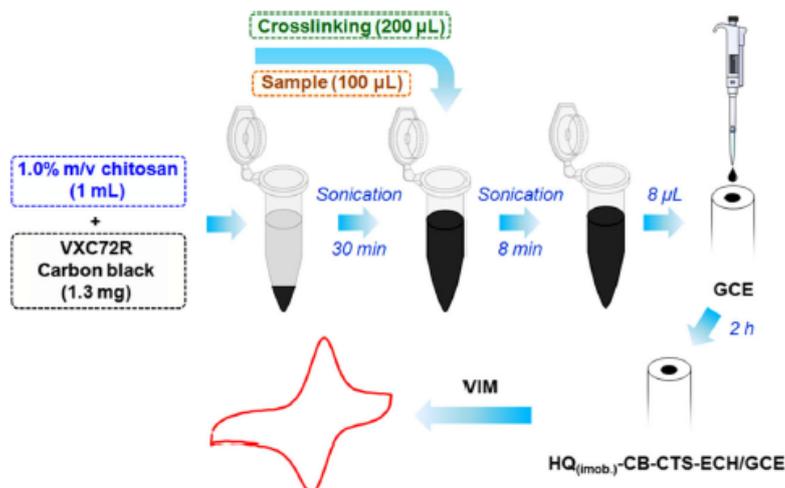
The carbon black dispersion was prepared by dispersing 1.3 mg of carbon black in 1.0 mL of CTS solution (1.0% *m/v*). This mixture was placed under ultrasonic agitation for 30 min. Afterwards, 100  $\mu\text{L}$  of hydroquinone standard (or sample) and 200  $\mu\text{L}$  of 1.0% (*v/v*) ECH solution were added, and this dispersion was sonicated for 8 min. Eight microliters of the obtained dispersion was transferred to the GCE surface and then the solvent was evaporated for 2 h at room temperature. The obtained sensor was named as HQ<sub>(immob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE.

### Analytical procedure

Initially, preliminary studies were performed using CV and DPV in order to obtain information about the hydroquinone electroactivity when it is immobilized within a carbon black-based crosslinked chitosan film. In this step, we also tested the advantage of carbon black as the conductive carbon material from the comparison with graphite powder, as a classic and low-cost conductive carbon form. After selecting the conductive material for hydroquinone determination, the best working conditions were obtained from a systematic study of the experimental parameters, such as supporting electrolyte (pH, ionic strength, and chemical composition), and the DPV parameters (scan rate, amplitude, and modulation time). For the studies related to supporting electrolyte, CV experiments were performed at scan rate of 50  $\text{mV s}^{-1}$  with pH ranging between 4.0 and 10.0. The analytical curve for hydroquinone was obtained from DPV measurements conducted for modified GCEs containing different amounts of hydroquinone immobilized within the film. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQ) were estimated using the relationships  $3 \times (\sigma_b/m)$  and  $10 \times (\sigma_b/m)$ , where  $\sigma_b$  is the standard deviation obtained for ten measurements of blank solution (supporting electrolyte) and  $m$  is the analytical sensitivity [48].

The procedure for preparation of modified working electrode was applied to the hydroquinone determination in dermatologic cream samples. Two samples used in this work were produced and purchased in São Paulo State (Brazil). A sample mass of 10.0 mg was mixed up to 2.0 mL with ultrapure water for the HQ solubilization, and 100  $\mu\text{L}$  of this mixture was used for electrode immobilization. Both samples were stored in the dark at room temperature, and they were named A1 and A2. The hydroquinone mass percentage of each sample was determined in triplicate using the analytical curve previously obtained. The hydroquinone content specified by the manufacturers is 4% *m/m* for both samples. All statistical calculations were performed using excel software, and a significance level of 95% was adopted.

**Fig. 1** Scheme of modified electrode preparation to perform hydroquinone determination by VIM

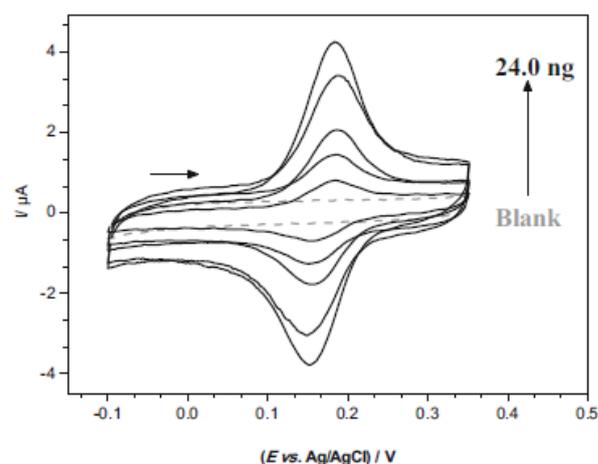


## Results and discussion

### Electrochemical response of immobilized hydroquinone molecules

In the first step of the work, the electroactivity of hydroquinone target analyte when immobilized within a conductive film was investigated. In Fig. 2 are shown the cyclic voltammograms recorded in  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution (pH 5.0) using an  $\text{HQ}_{(\text{imob.})}$ -CB-CTS-ECH/GCE-modified electrode containing different mass of immobilized hydroquinone in a potential range from  $-0.1$  to  $+0.35 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl ( $3.0 \text{ mol L}^{-1}$  KCl) raised at  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . The cyclic voltammograms showed an oxidation peak at  $+0.18 \text{ V}$ , and, changing the potential scan direction, a reduction peak at  $+0.15 \text{ V}$  can be observed resulting in a peak potential separation ( $\Delta E_p$ ) of  $30 \text{ mV}$ . The ratio between anodic ( $I_{pa}$ ) and cathodic current ( $I_{pc}$ ) was close to 1. Moreover, the peak potential separation was independent of hydroquinone concentration, which is a typical behavior of reversible redox processes and, additionally, it involves the transfer of two electrons once that  $\Delta E_p$  value is near from the expected ( $29.6 \text{ mV}$ ) considering the relationship from cyclic voltammetry theory [49]. CV experiments at different scan rates ( $10$ – $200 \text{ mV s}^{-1}$ ) were carried out. The anodic and cathodic peak currents ( $I_p$ ) varied with scan rate, and a linear plot of  $I_p$  versus  $\nu^{0.7}$  was obtained as it is possible to observe in Fig. 3. With these results, we can infer that the involved process is a mix of diffusion and adsorption process. This behavior is in accordance with previous works that report the electrochemistry of immobilized organic microparticles [8, 50] suggesting that the observed analytical signal is an average of various immobilized microparticles with different sizes. A confirmation that HQ remained immobilized within crosslinked chitosan/carbon black film was observed by cyclic voltammetry study (Fig. 4). One hundred scans were

recorded and the obtained RSDs values were 5.3 and 10.8 for anodic and cathodic currents, respectively. The high stability of immobilized HQ could be attributed to the hydrogen bond between the hydroxyl groups of HQ molecule and amine groups of chitosan polymer and/or the formation of quinhydrone, where a 1:1 molecular complex of electrogenerated quinone [8]. Furthermore, we can infer that the process is a genuine solid-state process [6, 7], where the electron transfer and an ion transfer occur simultaneously [7]. Additionally, we believe that this HQ-reversible redox reaction happens due to an insertion of ions from the electrolyte into the microparticle surface. Once the immobilized microparticle is a good electronic conductor and the analyte has a certain solubility in the solution [51], we believe that the diffusion layer is limited to the interface between three-phase



**Fig. 2** Cyclic voltammograms recorded in  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution (pH 5.0) using the  $\text{HQ}_{(\text{imob.})}$ -CB-CTS-ECH/GCE-modified electrode containing different immobilized hydroquinone mass/film: 0.00 (blank), 2.70, 5.40, 11.0, 16.0, and 24.0 ng

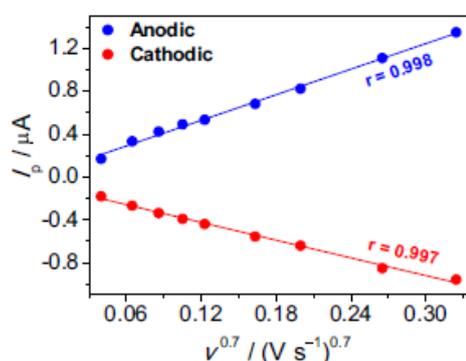


Fig. 3 Plots of  $I_p$  vs.  $v^{0.7}$  obtained for anodic and cathodic peak currents of  $HQ_{(mob)}$ -CB-CTS-ECH/GCE-modified electrode

junction. So, the mass transfer can be described by the planar diffusion model [52]. In addition, considering the cyclic voltammograms of Fig. 2, it was possible to note that anodic ( $I_{pa}$ ) and cathodic peak currents ( $I_{pc}$ ) increased through the different immobilized hydroquinone mass, suggesting the possibility of quantitative hydroquinone determination using voltammetry of immobilized microparticles strategy.

#### Influence of experimental parameters

Initially, experiments were performed to find better preparation conditions of the chitosan film containing the target analyte immobilized. Thus, the influence of conductive material type and crosslinking agent were evaluated, as well as the strategy followed for construction of the crosslinked chitosan film. The idea in these assays was to produce a stable chitosan film over a GCE substrate ensuring a high analytical signal. In the case of conductive material, the graphite powder and carbon black were evaluated considering the low cost, good conductivity, and wide availability of these carbon-based materials. For both cases, the crosslinked chitosan films were prepared containing 40 ng of immobilized hydroquinone.

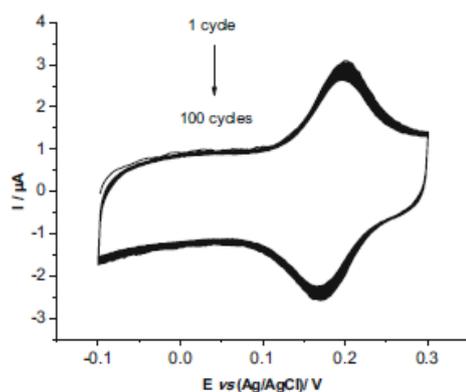
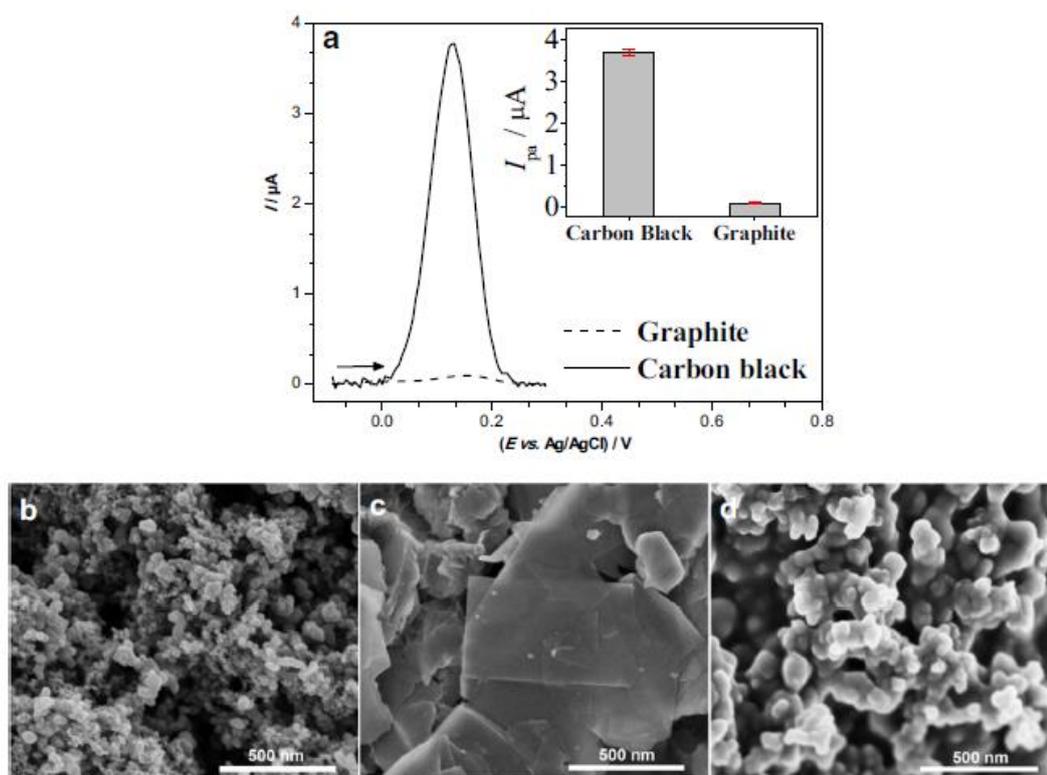


Fig. 4 Cyclic voltammograms (100 cycles) recorded in  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution (pH 5.0) using the  $HQ_{(mob)}$ -CB-CTS-ECH/GCE-modified electrode. CV conditions: start potential =  $-0.1 \text{ V}$ , end potential =  $0.3 \text{ V}$ , scan rate =  $50 \text{ mV s}^{-1}$

Figure 5a provides the differential pulse (DP) voltammograms recorded using the GCEs modified with chitosan films based on carbon black and graphite, and both present appropriate conductivity to be used as modifier in the design of the proposed chitosan film. As it can be seen, the use of crosslinked CTS film containing carbon black showed a significant increase in the hydroquinone analytical signal. Comparatively, the anodic peak current obtained using the carbon black-modified electrode was approximately 47 times greater than that obtained using the graphite-modified electrode. Therefore, carbon black was selected as the conductive material for chitosan film construction for further studies. The best performance of carbon black instead of graphite can be associated with the higher surface area, derived from the high porosity and nanometer scale of carbon black particles compared to graphite powder as can be observed from the scanning electron microscopy (SEM) images presented in Figs. 5b, c. Figure 5d consists of SEM images recorded for the crosslinked chitosan film containing CB nanoparticles (with ECH crosslinking agent), showing that the chitosan film confined carbon black nanoparticles forming a homogeneous film.

Two different strategies to obtain crosslinked chitosan films were tested using GA or ECH as a crosslinking agent. Previous reports demonstrated that crosslinking agent could interfere on the sensor response [28, 53]. Therefore, we evaluated the effect of crosslinking chitosan polymer via hydroxyl (ECH) or amine (GA) groups. For these assays, two crosslinking agent solutions (2.5% (v/v) GA and 1.0% (v/v) ECH) were used and the analytical signal recorded for a hydroquinone immobilized (mass of 20 ng) was obtained (not showed here). Under this condition, the peak current obtained with ECH was about 65 times higher than the one obtained using the GA crosslinked chitosan film. Therefore, ECH was selected as the crosslinking agent for further studies.

The chitosan crosslinking procedure for preparation of the modified electrode also was studied. For that, two simple procedures were tested. In both cases, a fixed immobilized hydroquinone mass of 50 ng was applied. In the first procedure, the ECH crosslinking agent was added in the CB-CTS dispersion and, therefore, the chitosan crosslinking reaction took place before covering the GCE substrate. The experimental details of this first procedure are those described in the experimental section (see the “Preparation of the modified working electrode” section). In the case of the second procedure, an aliquot of ECH solution was added on the GCE surface after the addition of the CB-CTS dispersion containing hydroquinone on the GCE surface as follows: 6.8  $\mu\text{L}$  of CB-CTS dispersion containing hydroquinone was dropped onto the GCE surface and, next, 1.2  $\mu\text{L}$  of 1.0% (v/v) ECH solution was carefully added. The mixture onto GCE surface was mixed carefully, and the solvent was evaporated for 2 h at room temperature. Thus, the crosslinking chitosan reaction takes

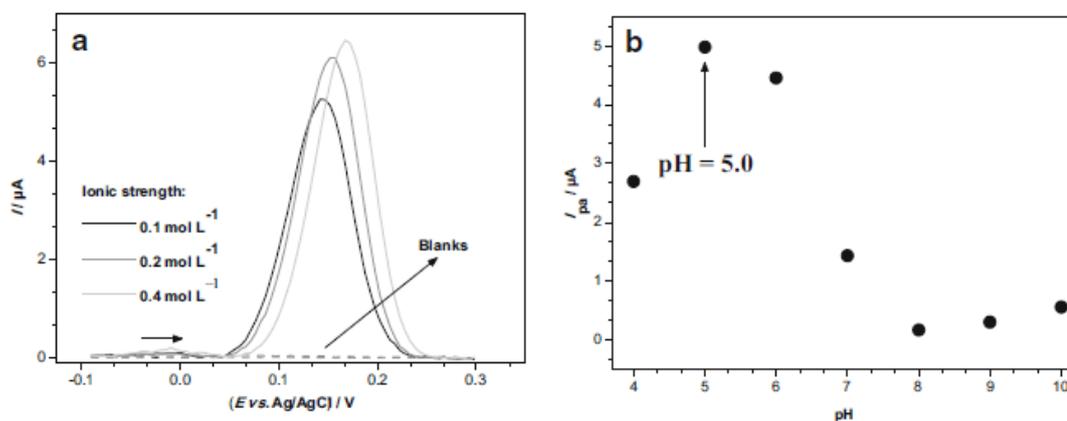


**Fig. 5** a Differential pulse voltammograms recorded in  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution (pH 5.0) using the GCEs modified with crosslinked chitosan-CB and crosslinked chitosan-graphite films containing  $40.0 \text{ ng}$  of immobilized hydroquinone. DPV conditions: start

potential =  $-0.1 \text{ V}$ , end potential =  $+0.35 \text{ V}$ , scan rate =  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude =  $25 \text{ mV}$ , and interval time =  $50 \text{ ms}$ . Inset: Graphic of  $I_{p}$  vs. carbon material. SEM image obtained for b carbon black, c graphite, and d crosslinked chitosan-CB film

place directly on the electrode surface. The modified electrodes used in the first procedure showed an enhanced and more stable analytical signal towards hydroquinone electro-oxidation (not showed here). The hydroquinone peak current obtained by using this strategy was about three times higher than those recorded by using the electrode obtained from the

second strategy. Moreover, comparing the signal of three modified electrodes, the relative standard deviation (RSD) values obtained were 3.0 and 12.4% in the first and in the second procedure, respectively. Therefore, the analytical signal recorded using the first preparation procedure was more stable and reproducible. This strategy was adopted for the next



**Fig. 6** a Differential pulse voltammograms recorded using the  $\text{HQ}_{(\text{mob})}$ -CB-CTS-ECH/GCE-modified electrode containing  $40.0 \text{ ng}$  of hydroquinone in phosphate buffer solution (pH 5.0) with different ionic

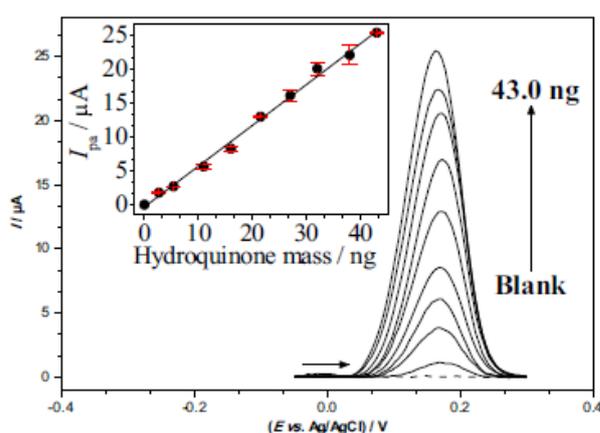
strengths:  $0.1$ ,  $0.2$ , and  $0.4 \text{ mol L}^{-1}$ . DPV conditions: start potential =  $-0.1 \text{ V}$ , end potential =  $+0.35 \text{ V}$ , scan rate =  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude =  $80 \text{ mV}$ , and interval time =  $35 \text{ ms}$ . b Graphic of  $I_{p}$  vs. pH

**Table 1** Selection of DPV parameters

Parameter	Studied range	Optimum value
Scan rate ( $\text{mV s}^{-1}$ )	2.5–10	5
Amplitude (mV)	10–100	80
Modulation time (ms)	10–40	35

assays and, the best performance from the use of this strategy can be related to a better homogeneity of the obtained film.

The influence of chemical composition, pH, ionic strength, and supporting electrolyte were investigated. Regarding the chemical composition, 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl, 0.1 mol L<sup>-1</sup> acetate buffer solution (pH = 5.0), and 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH = 5.0) were tested. The intensity and shape of the anodic peak current points that the best response for the proposed electrode was obtained in the phosphate buffer solution. Then, the influence of the phosphate buffer ionic strength solution was studied for 0.1, 0.2, and 0.4 mol L<sup>-1</sup> solutions at pH = 5.0. In Fig. 6a, we can observe that the anodic peak current increased up to 0.4 mol L<sup>-1</sup> ionic strength; however, it was selected 0.2 mol L<sup>-1</sup>, since for 0.4 mol L<sup>-1</sup> ionic strength, the gain in current was not significant ( $p = 0.07$ ) and led to a positive shift of the peak potential. The pH dependence of hydroquinone electrochemical response was studied using 0.2 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solutions with pH ranging between 4.0 and 10.0. The graphic of  $I_p$  versus pH is shown in Fig. 6b. The obtained DP voltammograms demonstrated that the supporting electrolyte pH directly influenced the hydroquinone oxidation reaction. Besides, the hydroquinone oxidation peak current was higher between pH 4.0 and 5.0, and with the pH increase, this signal gradually decreased, as expected,



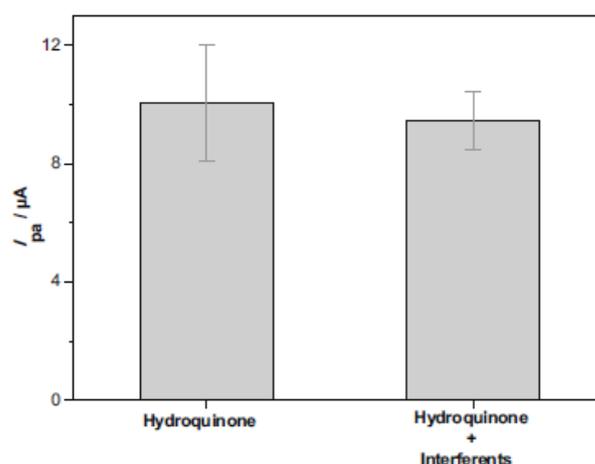
**Fig. 7** Differential pulse voltammograms recorded in 0.2 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH 5.0) using the HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE-modified electrode containing different immobilized hydroquinone mass: 0.00 (blank), 2.70, 5.40, 11.0, 16.0, 21.5, 27.0, 32.0, 38.0, and 43.0 ng. DPV conditions: start potential = -0.1 V, end potential = +0.35 V, scan rate = 5 mV s<sup>-1</sup>, amplitude = 80 mV, and interval time = 35 ms. Inset: analytical curve ( $I_p$  vs. hydroquinone mass)

since the redox reaction involves protons. Therefore, 0.2 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH 5.0) was chosen as the supporting electrolyte for further experiments.

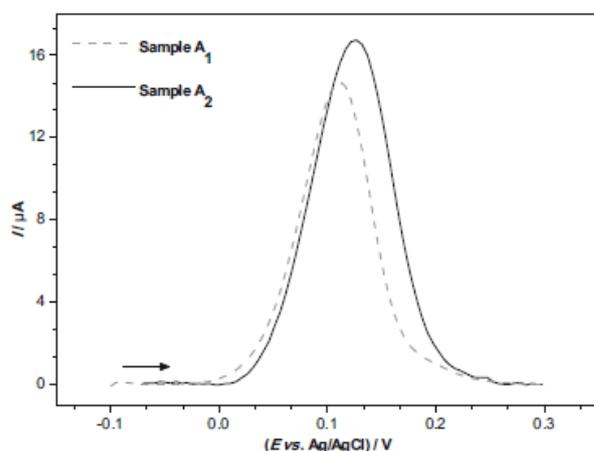
The parameters of DPV technique were optimized, being as follows: scan rate ( $\nu$ ), amplitude ( $A$ ), and modulation time ( $t_m$ ). The scan rate is one of the most important parameters to be studied, since it is directly related with the resolution and peak magnitude. Table 1 summarizes the ranges evaluated for each parameter and the selected values, respectively. The optimal values of each parameter were obtained taking into account the maximum peak current for the oxidation of immobilized hydroquinone (40 ng).

### Analytical features

Under the optimized experimental conditions, the analytical curve for hydroquinone was constructed to evaluate the analytical performance of the developed method. For this, DP voltammograms were recorded for HQ<sub>(imob.)</sub>-CB-CTS-ECH/GCE-modified electrodes containing different concentrations (in mass by film) of immobilized hydroquinone. Figure 7 shows the DP voltammograms and the respective analytical curve (in inset). The analytical signal of hydroquinone electro-oxidation was linear in the range from 2.7 to 43 ng, yielding the following linear regression equation (inset of Fig. 7):  $I_p$  (A) =  $-(3 \pm 1) \times 10^{-7} + (6 \pm 1) \times 10^2$  hydroquinone mass (g). The linear correlation coefficient of the calibration curve was 0.997, indicating a suitable linearity. The predicted LOD and LOQ values were 0.045 and 0.15 ng of hydroquinone, respectively. Therefore, high analytical sensitivity and very low detectability level were achieved from the combination of conductive and high surface area carbon black particles, high adherent crosslinked chitosan film and voltammetry of immobilized microparticles. We point out that the proposed



**Fig. 8** Analytical signals recorded for hydroquinone standard in the presence and absence of potential interferent substances (fluocinolone acetamide and tretinoin)



**Fig. 9** Differential pulse voltammograms recorded in  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution (pH 5.0) using the  $\text{HQ}_{(\text{immob.})}$ -CB-CTS-ECH/GCE-modified electrode containing 700 ng of immobilized dermatologic cream mass (samples  $A_1$  and  $A_2$ ). DPV conditions: start potential =  $-0.1 \text{ V}$ , end potential =  $+0.35 \text{ V}$ , scan rate =  $5 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude =  $80 \text{ mV}$ , and interval time =  $35 \text{ ms}$

analytical method is the first application of VIM for quantitative analysis, acting as pioneer work in opening several future possibilities for applications in analytical chemistry.

The repeatability of the modified electrode preparation was performed from experiments with two levels of immobilized hydroquinone mass (17 and 33 ng). In this study, three electrodes were prepared for each level of immobilized mass and independent measurements for each electrode were performed in triplicate. For both levels of immobilized hydroquinone mass, the relative standard deviation (RSD) showed low values ( $<5.0\%$ ), providing evidence of the repeatability, feasibility, and facility on the preparation of the proposed electrode.

The response stability of the modified electrode containing 22 ng of immobilized hydroquinone was evaluated by 30 successive measurements using DPV, in order to observe the lifetime response of the electrode. With this procedure, an RSD of 6.5% was obtained for peak current. Therefore, it was clear that after being immobilized within CB-CTS matrix, a very low mass of hydroquinone is lost from the electrode by mobility of hydroquinone molecules from the film to the aqueous medium and the sensor can be applied with high stability for DPV measurements.

**Table 2** Concentration levels of hydroquinone in the analysis of commercial dermatologic cream samples

Sample	Hydroquinone content ( $\text{mg kg}^{-1}$ )			RSD <sub>1</sub> <sup>a</sup> (%)	RSD <sub>2</sub> <sup>b</sup> (%)
	Labeled value	Comparative method	Proposed method		
A <sub>1</sub>	0.04	$0.044 \pm 0.001$	$0.038 \pm 0.001$	-5.0	-13.6
A <sub>2</sub>	0.04	$0.046 \pm 0.001$	$0.042 \pm 0.001$	+5.0	-8.7

<sup>a</sup>  $\text{RSD}_1 = 100 \times (\text{proposed} - \text{labeled})/\text{labeled}$

<sup>b</sup>  $\text{RSD}_2 = 100 \times (\text{proposed} - \text{comparative})/\text{comparative}$

The possible interference effects of some majority concomitant substances found in dermatologic cream samples were also investigated. Among the majority of substances present in this type of samples, fluocinolone acetonide and tretinoin stands out. The possible interference of these substances on the hydroquinone determination by the proposed VIM procedure was evaluated from measurements performed in the absence and presence of these compounds. The tested HQ/majority compound ratios for fluocinolone acetonide and tretinoin were 400:1 and 80:1, respectively (which are the typical ratios found in commercial cosmetic products). From the comparison of HQ analytical signal in the presence and absence of the possible potential interferents (Fig. 8), a relative standard deviation (RSD) equal to  $-1.7\%$  was obtained. This low RSD value demonstrated the selectivity of the proposed VIM procedure related to major substances present at cosmetic matrix samples.

#### Analysis of cosmetic samples

The proposed method based on combination of VIM technique and carbon black-based crosslinked chitosan films was applied for hydroquinone determination in two commercial dermatologic cream samples. In Fig. 9, it is possible to observe the voltammograms for both samples. The results obtained for the sample analysis by the proposed and comparative (UV-vis spectrophotometry) procedure are summarized in Table 2, and it is possible to observe similar results between both methods. In the sample A<sub>1</sub>, the hydroquinone concentration quantified were  $0.044$  and  $0.038 \text{ mg kg}^{-1}$  by comparative and proposed method, respectively. To the sample A<sub>2</sub>, the values of hydroquinone obtained were  $0.046$  and  $0.042$  by comparative and proposed method, respectively. The hydroquinone content specified by the manufacturers is  $4\% \text{ m/m}$  for both samples, and the results obtained with the proposed method (3.8 and 4.2% for A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>, respectively) showed similar concentration levels to that described by manufacturers. However, sample A<sub>2</sub> presented hydroquinone concentrations level higher than the recommended by Brazil's National Health Surveillance Agency ( $4\% \text{ m/m}$ ) [42]. The RSD percentages obtained for the comparison of labeled hydroquinone content and obtained by the proposed VIM procedure (RSD<sub>1</sub>) were lower than  $\pm 5.0\%$ . Comparing the results obtained by the

proposed and comparative procedures, RSD values ( $RSD_2$ ) for A1 and A2 were  $-13.6$  and  $-8.7\%$ , respectively, demonstrating the concordance of the results obtained by both methods. In addition, the statistical paired  $t$  test was applied, with the  $t_{\text{experimental}}$  (7.97) lower than the  $t_{\text{theoretical}}$  value (12.71) at a 95% confidence level, proving that the results of both procedures are statistically equal. These set of results proved the accuracy and reliability of the proposed VIM procedure, demonstrating the viability of this analytical strategy for hydroquinone monitoring in dermatologic cream samples.

## Conclusions

A new advance in the analytical exploring of VIM technique was reported in this work. This electroanalytical technique was combined with simple dropping-coating to provide determination of hydroquinone in dermatologic cream samples. The hydroquinone standard and samples were immobilized within a crosslinked chitosan film containing carbon black particles. All pertinent experimental parameters were subjected to optimization, and under optimum conditions, an analytical curve for hydroquinone was constructed in the linear range of 2.7 to 43 ng (correlation coefficient of 0.994) with LOD and LOQ of 0.045 and 0.15 ng, respectively. Through repeatability and lifetime studies, the proposed procedure efficacy of particle immobilization was demonstrated. Finally, cosmetic samples based on hydroquinone were directly and successfully analyzed by the proposed VIM procedure and the results are in accordance with the comparative method. The results reported in this work represent an exciting novelty for the electroanalytical chemistry scenario, and different new applications of VIM can be developed.

**Acknowledgments** We are grateful for the financial support of the following Brazilian Funding Agencies: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - award number 444150/2014-5), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). We would like to thank CAB English Lessons for the English correction.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Zoski CG (2007) Handbook of electrochemistry. Elsevier, Amsterdam
- Kulesza PJ, Cox JA (1998) Solid-state voltammetry—analytical prospects. *Electroanalysis* 10(2):73–80
- Scholz F, Nitschke L, Henrion G (1989) A new procedure for fast electrochemical analysis of solid materials. *Naturwissenschaften* 76(2):71–72
- Scholz F, Lange B (1992) Abrasive stripping voltammetry—an electrochemical solid state spectroscopy of wide applicability. *TrAC Trends Anal Chem* 11(10):359–367
- Cepriá G, Aranda C, Pérez-Arantegui J, Lacueva F, Castillo JR (2001) Voltammetry of immobilised microparticles: a powerful analytical technique to study the physical and chemical composition of brass. *J Electroanal Chem* 513(1):52–58
- Doménech-Carbó A, Labuda J, Scholz F (2013) Electroanalytical chemistry for the analysis of solids: characterization and classification (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem* 85(3):609–631
- Scholz F, Schröder U, Gulaboski R, Doménech-Carbó A (2015) Electrochemistry of immobilized particles and droplets. Springer, Berlin
- Komorsky-Lovrić Š, Mirčeski V, Scholz F (1999) Voltammetry of organic microparticles. *Microchim Acta* 132(1):67–77
- Martini M, Carvalho LM, Blasco-Blasco A, Doménech-Carbó A (2015) Screening and authentication of herbal formulations based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. *Anal Methods* 7(14):5740–5747
- Doménech-Carbó A, Martini M, Carvalho LM, Viana C, Doménech-Carbó MT, Silva M (2013) Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. *J Pharm Biomed Anal* 74:194–204
- Doménech-Carbó A, Doménech-Carbó MT, Calisti M, Maiolo V (2010) Sequential identification of organic dyes using the voltammetry of microparticles approach. *Talanta* 81(1–2):404–411
- Jayarama Reddy S, Hermes M, Scholz F (1996) The application of abrasive stripping voltammetry for a simple and rapid screening of pesticides. *Electroanalysis* 8(10):955–958
- Novak I, Mlakar M, Komorsky-Lovrić Š (2013) Voltammetry of immobilized particles of cannabinoids. *Electroanalysis* 25(12):2631–2636
- Doménech-Carbó A, Ibars AM, Prieto-Mossi J, Estrelles E, Scholz F, Cebrian-Torrejón G, Martini M (2015) Electrochemistry-based chemotaxonomy in plants using the voltammetry of microparticles methodology. *New J Chem* 39(9):7421–7428
- Novak Jovanović I, Čižmek L, Komorsky-Lovrić Š (2016) Electrochemistry-based determination of pungency level of hot peppers using the voltammetry of microparticles. *Electrochim Acta* 208:273–281
- Scholz F, Lange B, Jaworski A, Pelzer J (1991) Analysis of powder mixtures with the help of abrasive stripping voltammetry and coulometry. *Fresenius J Anal Chem* 340(3):140–144
- Zhang S, Meyer B, Moh GH, Scholz F (1995) Development of analytical procedures based on abrasive stripping coulometry and voltammetry for solid state phase microanalysis of natural and synthetic tin-, arsenic-, and antimony-bearing sulfosalts and sulfides of thallium, tin, lead, and silver. *Electroanalysis* 7(4):319–328
- Doménech-Carbó A, Doménech-Carbó MT, Osete-Cortina L, Gimeno-Adelantado JV, Sánchez-Ramos S, Bosch-Reig F (2003) Quantitation of metal ions in archaeological glass by abrasive stripping square-wave voltammetry using graphite/polyester composite electrodes. *Electroanalysis* 15(18):1465–1475
- Doménech-Carbó A, Sánchez-Ramos S, Yusá-Marco DJ, Moya-Moreno M, Gimeno-Adelantado JV, Bosch-Reig F (2004) Electrochemical determination of boron in minerals and ceramic materials. *Anal Chim Acta* 501(1):103–111
- Doménech-Carbó A, Moya-Moreno M, Doménech-Carbó M (2004) Standard addition method applied to solid-state stripping voltammetry: determination of zirconium in minerals and ceramic materials. *Anal Bioanal Chem* 380(1):146–156
- Doménech-Carbó A, Doménech-Carbó MT, Gimeno-Adelantado JV, Bosch-Reig F (2006) H-point standard addition method applied

- to solid-state stripping voltammetry: quantitation of lead and tin in archaeological glazes. *Anal Bioanal Chem* 385(8):1552–1561
22. Bosch-Reig F, Doménech-Carbó A, Doménech-Carbó MT, Gimeno-Adelantado JV (2007) H-point standard addition method applied to voltammetry of microparticles. Quantitation of dyes in pictorial samples. *Electroanalysis* 19(15):1575–1584
  23. Chen S-M, Peng K-T, Lin K-C (2005) Preparation of thallium hexacyanoferrate film and mixed-film modified electrodes with cobalt(II) hexacyanoferrate. *Electroanalysis* 17(4):319–326
  24. Grygar T, van Ooschot IH (2002) Voltammetric identification of pedogenic iron oxides in paleosol and loess. *Electroanalysis* 14(5):339–344
  25. Meyer B, Zhang S, Scholz F (1996) The quantitative analysis of mixed crystals CuS x Se1-x with abrasive stripping voltammetry and a redetermination of the solubility product of CuSe and the standard potential of the Cu/CuSe electrode. *Fresenius J Anal Chem* 356(3):267–270
  26. Cepriá G, García-Gareta E, Pérez-Arantegui J (2005) Cadmium yellow detection and quantification by voltammetry of immobilized microparticles. *Electroanalysis* 17(12):1078–1084
  27. Vicentini FC, Silva TA, Pellatieri A, Janegitz BC, Fatibello-Filho O, Faria RC (2014) Pb(II) determination in natural water using a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan. *Microchem J* 116:191–196
  28. Janegitz BC, Figueiredo-Filho LCS, Marcolino-Junior LH, Souza SPN, Pereira-Filho ER, Fatibello-Filho O (2011) Development of a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan for cadmium(II) and mercury(II) determination. *J Electroanal Chem* 660(1):209–216
  29. Ghica ME, Pauliukaite R, Fatibello-Filho O, Brett CMA (2009) Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors. *Sensors Actuat B: Chem* 142(1):308–315
  30. Kalcher K, Kauffmann JM, Wang J, Švancara I, Vytras K, Neuhold C, Yang Z (1995) Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: a review with particular emphasis on the period 1990–1993. *Electroanalysis* 7(1):5–22
  31. Uslu B, Ozkan SA (2007) Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Anal Lett* 40(5):817–853
  32. Vicentini FC, Ravanini AE, Figueiredo-Filho LCS, Iniesta J, Banks CE, Fatibello-Filho O (2015) Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms. *Electrochim Acta* 157:125–133
  33. Arduini F, Zanolini C, Cinti S, Terzi F, Moscone D, Palleschi G, Seeber R (2015) Effective electrochemical sensor based on screen-printed electrodes modified with a carbon black-Au nanoparticles composite. *Sensors Actuat B: Chem* 212:536–543
  34. Portaccio M, Di Tuoro D, Arduini F, Moscone D, Cammarota M, Mita DG, Lepore M (2013) Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine-carbon black nanocomposite, for bisphenol A detection. *Electrochim Acta* 109:340–347
  35. Lupetti KO, Zanolini Neto G, Fatibello-Filho O (2006) Sweet potato tissue-epoxy resin composite biosensor for hydroquinone determination in photographic process wastewater. *J Braz Chem Soc* 17:1329–1333
  36. Ganesh PS, Swamy BEK (2016) Voltammetric resolution of catechol and hydroquinone at eosin Y film modified carbon paste electrode. *J Mol Liq* 220:208–215
  37. Yoshimura K, Tsukamoto K, Okazaki M, Virador VM, Lei T-C, Suzuki Y, Uchida G, Kitano Y, Harii K (2001) Effects of all-trans retinoic acid on melanogenesis in pigmented skin equivalents and monolayer culture of melanocytes. *J Dermatol Sci* 27(Supplement 1):68–75
  38. Tse TW (2010) Hydroquinone for skin lightening: safety profile, duration of use and when should we stop? *J Dermatol Treat* 21(5):272–275
  39. Gómez-Taylor Corominas B, Catalá Icardo M, Lahuerta Zamora L, García Mateo JV, Martínez Calatayud J (2004) A tandem-flow assembly for the chemiluminometric determination of hydroquinone. *Talanta* 64(3):618–625
  40. Aldrich Chemical C (1990) Aldrich: [catalog handbook of fine chemicals]. Aldrich Chemical Co., Milwaukee
  41. López García P, Rocha Miritello Santoro MI, Kedor-Hackman ERM, Kumar Singh A (2005) Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. *J Pharm Biomed Anal* 39(3–4):764–768
  42. Brasil (2000) Resolução RDC no. 79, de 28 de agosto de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/79\\_2000.pdf](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/79_2000.pdf). Accessed 10 Jan 2017
  43. Hydroquinone Studies Under The National Toxicology Program (NTP) (2015) U.S. Food and Drug Administration (FDA). <https://www.fda.gov/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/ocder/ucm203112.htm>. Accessed 10 Jan 2017
  44. Wang L, Zhang Y, Du Y, Lu D, Zhang Y, Wang C (2012) Simultaneous determination of catechol and hydroquinone based on poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene-modified glassy carbon electrode. *J Solid State Electrochem* 16(4):1323–1331
  45. Liu X, Li Y, Liu X, Zeng X, Kong B, Luo S, Wei W (2012) Simple sensor for simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers. *J Solid State Electrochem* 16(3):883–889
  46. Li S-J, Xing Y, Deng D-H, Shi M-M, Guan P-P (2015) A comparative study of different types of reduced graphene oxides as electrochemical sensing platforms for hydroquinone and catechol. *J Solid State Electrochem* 19(3):861–870
  47. United States Pharmacopeial Convention (2012) USP35 NF30: U. S. pharmacopoeia national formulary. United States Pharmacopeial, Rockville
  48. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC (2004) Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quim Nov* 27(5):771–780
  49. Brett CMA, Brett AMO (1993) *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. Oxford Science Publications, Oxford
  50. Komorsky-Lovrić Š (1997) Voltammetry of azobenzene microcrystals. *J Solid State Electrochem* 1(1):94–99
  51. Scholz F, Lovrić M, Stojek Z (1997) The role of redox mixed phases {ox x (C n red)1 - x } in solid state electrochemical reactions and the effect of miscibility gaps in voltammetry. *J Solid State Electrochem* 1(2):134–142
  52. Lovrić M, Hermes M, Scholz F (2000) Solid state electrochemical reactions in systems with miscibility gaps. *J Solid State Electrochem* 4(7):394–401
  53. Janegitz BC, Marcolino-Junior LH, Campana-Filho SP, Faria RC, Fatibello-Filho O (2009) Anodic stripping voltammetric determination of copper(II) using a functionalized carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan. *Sensors Actuat B: Chem* 142(1):260–266

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

ADAMS, Ralph N.. Carbon Paste Electrodes. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 30, n. 9, p.1576-1576, set. 1958. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60141a600>.

AFKHAMI, A e KHATAMI, H. A. Indirect Kinetic–Spectrophotometric Determination of Resorcinol, Catechol, and Hydroquinone. *Journal of Analytical Chemistry*, [s.l.], v 56, pp 429–432. Issue 5, May 2001. Elsevier BV.

AFZALI, Daryoush et al. Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol. *Materials Science And Engineering: C*, [s.l.], v. 43, p.97-101, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.035>.

ALAQAD, Khaled M. et al. Novel graphene modified carbon-paste electrode for promazine detection by square wave voltammetry. **Journal Of Molecular Liquids**, [s.l.], v. 252, p.75-82, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.12.108>.

ALDRICH: Catalog Handbook of fine chemicals. 1990. Disponível em: <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/General\\_Information/1/chemfiles\\_113\\_link\\_v1.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/General_Information/1/chemfiles_113_link_v1.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2018.

AL-HOSSAINY, Ahmed F. et al. Determination of cadmium and lead in perch fish samples by differential pulse anodic stripping voltammetry and furnace atomic absorption spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry*, [s.l.], v. 10, p.347-354, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.09.005>

ALMEIDA, Leandro S. et al. Systematic evaluation of sample preparation method for simultaneous voltammetric determination of Zn, Cd, Pb, and Cu in macroalgae. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.595-605, 22 ago. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0935-z>.

ANVISA (2000). Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [s.i]. Brasil, 03 ago. 2000.

ANVISA (2012). Resolução nº 03, de 20 de janeiro de 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil, 17 jan. 2012.

ANVISA (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa regulamenta uso de chumbo e outras substâncias em cosméticos - RDC nº 15/2013, 28 de março de 2013. Disponível em: [portal.anvisa.gov.br](http://portal.anvisa.gov.br)

ARAGÓ, Miriam et al. Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and resorcinol by voltammetry using graphene screen-printed electrodes and partial least squares calibration. **Talanta**, [s.l.], v. 160, p.138-143, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.007>.

ARDILA, Jorge Armando et al. Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of bezafibrate using a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film. **The Analyst**, [s.l.], v. 139, n. 7, p.1762-1768, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3an02016a>.

ARDUINI, F. et al. Effective electrochemical sensor based on screen-printed electrodes modified with a carbon black-Au nanoparticles composite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 212, p.536-543, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.051>.

ARDUINI, Fabiana et al. Carbon Black-Modified Screen-Printed Electrodes as Electroanalytical Tools. *Electroanalysis*, [s.l.], v. 24, n. 4, p.743-751, 6 fev. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201100561>.

ARDUINI, Fabiana et al. Hg<sup>2+</sup> detection by measuring thiol groups with a highly sensitive screen-printed electrode modified with a nanostructured carbon black film. *Electrochimica Acta*, [s.l.], v. 56, n. 11, p.4209-4215, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2011.01.094>.

ASHENGROPH, Morahem et al. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and vanillic acid. **New Biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.656-664, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2011.06.009>.

BAKIRCIOGLU, Dilek; KURTULUS, Yasemin Bakircioglu; UCAR, Gokhan. Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.202-207, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.017>.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*. 2. ed. Nova York: John Wiley & SONS, INC, 2001.

BEAUDRY, Francis; GUÉNETTE, Sarah Annie; VACHON, Pascal. Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography–quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. **Biomedical Chromatography**, [s.l.], v. 20, n. 11, p.1216-1222, 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.687>.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and*

Biopharmaceutics, [s.l.], v. 57, n. 1, p.19-34, jan. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00161-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00161-9).

BOLASINA, Sergio Néstor et al. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. *Aquaculture Reports*, [s.l.], v. 6, p.56-60, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.04.002>.

BOUWE, Rose G.b. et al. Structural characterisation of 1,10-phenanthroline–montmorillonite intercalation compounds and their application as low-cost electrochemical sensors for Pb(II) detection at the sub-nanomolar level. *Applied Clay Science*, [s.l.], v. 52, n. 3, p.258-265, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2011.02.028>.

BRETT CMA, BRETT AMO (1993) *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications* Oxford Science Publications, Oxford.

CARVALHO, Leandro M. de et al. (a) Voltametria de micropartículas imobilizadas: fundamentos e aplicações analíticas. *Química Nova*, [s.l.], v. 33, n. 8, p.1765-1772, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000800025> (a).

CARVALHO, Leandro M. de et al. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. ***Forensic Science International***, [s.l.], v. 202, n. 1-3, p.75-81, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.04.030> (b).

CEPRIÁ, G. et al. Cadmium Yellow Detection and Quantification by Voltammetry of Immobilized Microparticles. *Electroanalysis*, [s.l.], v. 17, n. 12, p.1078-1084, jun. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200403217>.

CHAHID, Adil et al. Contents of cadmium, mercury and lead in fish from the Atlantic sea (Morocco) determined by atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 147, p.357-360, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.008>.

CHAMJANGALI, M. Arab et al. A voltammetric sensor based on the glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotube/poly(pyrocatechol violet)/bismuth film for determination of cadmium and lead as environmental pollutants. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 216, p.384-393, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.058>.

CHAUHAN, Alok P.s.; CHAWLA, Komal. Comparative studies on Graphite and Carbon Black powders, and their dispersions. **Journal Of Molecular Liquids**, [s.l.], v. 221, p.292-297, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.05.043>.

COWING, Daniel; POWELL, Adam; JOHNSON, Magnus. Evaluation of different concentration doses of eugenol on the behaviour of *Nephrops norvegicus*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 442, p.78-85, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.039>.

DADFARNIA, Shayessteh; SHABANI, Ali Mohammad Haji. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 658, n. 2, p.107-119, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.022>.

DHOOT, G. et al. Determination of eugenol diffusion through LLDPE using FTIR-ATR flow cell and HPLC techniques. **Polymer**, [s.l.], v. 50, n. 6, p.1470-1482, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2009.01.026>.

DIAS, Daiane et al. The interaction of a polycrystalline gold electrode with ethanethiol in alkaline solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 690, p.121-126, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.11.015>.

DOMÉNECH-CARBÓ, Antonio et al. Electrochemical determination of boron in minerals and ceramic materials. *Analytica Chimica Acta*, [s.l.], v. 501, n. 1, p.103-111, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.021>.

DOMÉNECH-CARBÓ, Antonio et al. Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [s.l.], v. 74, p.194-204, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.10.031>.

DOMÉNECH-CARBÓ, Antonio et al. Sequential identification of organic dyes using the voltammetry of microparticles approach. *Talanta*, [s.l.], v. 81, n. 1-2, p.404-411, 15 abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.016>.

DOMÉNECH-CARBÓ, Antonio. et al. Quantitation of Metal Ions in Archaeological Glass by Abrasive Stripping Square-Wave Voltammetry Using Graphite/Polyester Composite Electrodes. *Electroanalysis*, [s.l.], v. 15, n. 18, p.1465-1475, out. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200302716>.

DOMÉNECH-CARBÓ, Antonio; LABUDA, Jan; SCHOLZ, Fritz. Electroanalytical chemistry for the analysis of solids: Characterization and classification (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, [s.l.], v. 85, n. 3, p.609-631, 16 jan. 2012. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1351/pac-rep-11-11-13>.

DOMÉNECH-CARBÓ, A.. Electrochemical analysis of metallic heritage artefacts: voltammetry of microparticles (VMP). **Corrosion And Conservation Of Cultural Heritage Metallic Artefacts**, [s.l.], p.165-189, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1533/9781782421573.2.165>.

DOMÍNGUEZ, Irene; DOMÉNECH-CARBÓ, Antonio. Screening and authentication of tea varieties based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 210, p.491-499, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.009>.

DOMÉNECH-CARBÓ, Antonio et al. Detection of archaeological forgeries of Iberian lead plates using nanoelectrochemical techniques. The lot of fake plates from Bugarra (Spain). **Forensic Science International**, [s.l.], v. 247, p.79-88, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.12.001>.

DRAELOS, Zoe Diana et al. Special considerations in eye cosmetics. *Clinics In Dermatology*, [s.l.], v. 19, n. 4, p.424-430, jul. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0738-081x\(01\)00204-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0738-081x(01)00204-8).

DUBES, G.r.; MASOUD, A.n.; AL-MOSLIH, M.i.. High-Performance Liquid Chromatography of Preparations of Ribonucleic Acid Inactivator(s) from Cupric Ion and Hydroquinone Before and After Treatment with Histidine. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.300-303, mar. 1983. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600720323>.

FDA (2015). Hydroquinone Studies Under The National Toxicology Program (NTP). (2015) U.S. Food and Drug Administration – FDA.

FENG, Qingliang et al. A novel way for detection of eugenol via poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene-MoS<sub>2</sub> nano-flower fabricated electrochemical sensor. *Sensors And Actuators B: Chemical*, [s.l.], v. 192, p.1-8, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.087>.

FIEDLER, D. A.; Scholz, F. *Em Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*; Scholz, F., ed.; Springer: Berlin, 2005, cap. II.8.

GANESH, P.s.; SWAMY, B.e. Kumara. Voltammetric resolution of catechol and hydroquinone at eosin Y film modified carbon paste electrode. **Journal Of Molecular Liquids**, [s.l.], v. 220, p.208-215, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.04.078>.

GARCIA, Livia Luiza Costa et al. Square-wave voltammetric determination of paraquat using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a dihexadecylhydrogenphosphate (DHP) film. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 181, p.306-311, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.01.091>.

GARCÍA, P. López et al. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, [s.l.], v. 39, n. 3-4, p.764-768, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.016>.

GeCA, Iwona; KOROLCZUK, Mieczyslaw. Anodic stripping voltammetry following double deposition and stripping steps: Application of a new approach in the course of lead ion determination. **Talanta**, [s.l.], v. 171, p.321-326, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.008>.

GOMEZ-TAYLOR, COROMINAS et al. A tandem-flow assembly for the chemiluminometric determination of hydroquinone. *Talanta*, [s.l.], v. 64, n. 3, p.618-625, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.031>.

HUANG, Mei-rong; DING, Yong-bo; LI, Xin-gui. Combinatorial Screening of Potentiometric Pb(II) Sensors from Polysulfoaminoanthraquinone Solid Ionophore. *Acs Combinatorial Science*, [s.l.], v. 16, n. 3, p.128-138, 24 fev. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/co400140g>.

JAGANATHAN, Saravana Kumar; SUPRIYANTO, Eko. Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Molecules*, [s.l.], v. 17, n.12, p.6290-6304, 25 maio 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17066290>.

JANEGITZ, Bruno C. et al. Anodic stripping voltammetric determination of copper(II) using a functionalized carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked

chitosan. *Sensors and Actuators B: Chemical*, [s.l.], v. 142, n. 1, p.260-266, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2009.08.033>.

JANEGITZ, Bruno C. et al. Development of a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan for cadmium(II) and mercury(II) determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, [s.l.], v. 660, n. 1, p.209-216, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.07.001>.

JANEGITZ, Bruno C. et al. The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, [s.l.], v. 220, p.805-813, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.020>.

JOVANOVIĆ, Ivana Novak; ČIŽMEK, Lara; KOMORSKY-LOVRIĆ, Šebojka. Electrochemistry-based determination of pungency level of hot peppers using the voltammetry of microparticles. ***Electrochimica Acta***, [s.l.], v. 208, p.273-281, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.04.066>.

KAMATOU, Guy P.; VERMAAK, Ilze; VILJOEN, Alvaro M.. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. *Molecules*, [s.l.], v. 17, n. 12, p.6953-6981, 6 jun. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules17066953>.

KAROUSOS, Dionysios S. et al. Sonochemical one-pot synthesis of Pt – Carbon black nanocomposite PEMFC electrocatalyst. ***Ultrasonics Sonochemistry***, [s.l.], v. 35, p.591-597, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.023>.

KAWDE, A. et al. Novel Ce-incorporated zeolite modified-carbon paste electrode for simultaneous trace electroanalysis of lead and cadmium. ***Microporous And Mesoporous Materials***, [s.l.], v. 243, p.1-8, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.02.008>.

KE, Changliang et al. Simultaneous determination of eugenol, isoeugenol and methyleugenol in fish fillet using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 1031, p.189-194, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.048>.

KIRKLAND, D.j. et al. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: An appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, [s.l.], v. 588, n. 2, p.88-105, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.09.006>.

KOMORSKY-LOVRIĆ, Šebojka; NIGOVIĆ, Biljana. Identification of 5-aminosalicylic acid, ciprofloxacin and azithromycin by abrasive stripping voltammetry. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.81-89, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.05.008>.

KOMORSKY-LOVRIĆ, Šebojka. Voltammetry of azobenzene microcrystals. *Journal of Solid State Electrochemistry*, [s.l.], v. 1, n. 1, p.94-99, 11 jul. 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s100080050028>.

KOMORSKY-LOVRIČ, Šebojka; MIRČESKI, Valentin; SCHOLZ, Fritz. Voltammetry of Organic Microparticles. *Mikrochimica Acta*, [s.l.], v. 132, n. 1, p.67-77, 17 nov. 1999. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/pl00010075>.

Krug, J. F. Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª Ed. rev., Piracicaba, 2010.

KULESZA, Pawel J.; COX, James A.. Solid-State Voltammetry — Analytical Prospects. *Electroanalysis*, [s.l.], v. 10, n. 2, p.73-80, fev. 1998. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4109\(199802\)10:23.0.co;2-k](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-4109(199802)10:23.0.co;2-k).

KUMAR, A. Anil et al. Voltammetric determination of catechol and hydroquinone at poly(niacinamide) modified glassy carbon electrode. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 799, p.505-511, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.026>.

KUSKUR, Chethan M.; SWAMY, B.e. Kumara; JAYADEVAPPA, H.. Poly (naphthol green B) modified carbon paste electrode sensor for catechol and hydroquinone. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 804, p.99-106, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.09.039>.

KUWANA, Theodore.; FRENCH, W. G.. Electrooxidation or Reduction of Organic Compounds into Aqueous Solutions Using Carbon Paste Electrode. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.241-242, jan. 1964. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac60207a006>.

SARAN, Sagar et al. Validated RP-HPLC method to estimate eugenol from commercial formulations like Caturjata Churna, Lavangadi Vati, Jatiphaladi Churna, Sitopaladi Churna and clove oil. **Journal Of Pharmacy Research**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.53-60, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.013>.

SCHULTZ, FA e KUWANA T. Electrochemical studies of organic compounds dissolved in carbon-paste electrodes *Journal of Electroanalytical Chemistry*, [s.l.], v 10, p. 95-103, 1965.

LARINI, L. Toxicologia. 3<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Ed. Manole, 1997.

LEE, C et al. Metal contamination in urban, suburban, and country park soils of Hong Kong: A study based on GIS and multivariate statistics. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 356, n. 1-3, p.45-61, 1 mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.03.024>.

LI, Xueying et al. A novel design of engineered multi-walled carbon nanotubes material and its improved performance in simultaneous detection of Cd(II) and Pb(II) by square wave anodic stripping voltammetry. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 236, p.144-152, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.149>.

LIN, Cheng-hui et al. Determination of hydroquinone in cosmetic emulsion using microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.414-419, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.031>.

LIN, Xiaoyun; NI, Yongnian; KOKOT, Serge. Electrochemical mechanism of eugenol at a Cu doped gold nanoparticles modified glassy carbon electrode and its analytical application in food samples. *Electrochimica Acta*, [s.l.], v. 133, p.484-491, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.04.065>.

LIU, Zhimin et al. High sensitive simultaneous determination of hydroquinone and catechol based on graphene/BMIMPF<sub>6</sub> nanocomposite modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, [s.l.], v. 157, n. 2, p.540-546, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.05.019>.

LIU, Yuanxiang et al. Simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers based on thionine functionalized multiwall carbon nanotubes modified electrode. **Journal Of Applied Electrochemistry**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.667-674, 12 fev. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10800-014-0674-2>.

GARCÍA, P. López et al. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 39, n. 3-4, p.764-768, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.016>.

LOVRIC, Milivoj; HERMES, Michael; SCHOLZ, Fritz. Solid state electrochemical reactions in systems with miscibility gaps. *Journal of Solid State Electrochemistry*, [s.l.],

v. 4, n. 7, p.394-401, 5 set. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s100089900093>.

LUPETTI, Karina O.; ZANOTTO-NETO, Giacomo; FATIBELLO-FILHO, Orlando. Sweet potato tissue-epoxy resin composite biosensor for hydroquinone determination in photographic process wastewater. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.1329-1333, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532006000700020>.

LUQUE, Matilde; RÍOS, Angel; VALCÁRCEL, Miguel. Use of supported liquid membranes incorporated in a flow system for the direct determination of eugenol in spice samples. *The Analyst*, [s.l.], v. 125, n. 10, p.1805-1809, 2000. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b001974g>.

MACIEL, Juliana Villela et al. A combination of voltammetry of immobilized microparticles and carbon black-based crosslinked chitosan films deposited on glassy carbon electrode for the quantification of hydroquinone in dermatologic cream samples. **Journal Of Solid State Electrochemistry**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.2859-2868, 4 maio 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10008-017-3614-3>.

MARTINI, Mariele et al. Screening and authentication of herbal formulations based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. *Anal. Methods*, [s.l.], v. 7, n. 14, p.5740-5747, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5ay01145k>.

MAY, Geoffrey J.; DAVIDSON, Alistair; MONAHOV, Boris. Lead batteries for utility energy storage: A review. **Journal Of Energy Storage**, [s.l.], v. 15, p.145-157, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.est.2017.11.008>.

MCCREERY, Richard L.. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chemical Reviews*, [s.l.], v. 108, n. 7, p.2646-2687, jul. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr068076m>.

MEDIEN, H.a.a; ZAHRAN, A.a. Spectrophotometric kinetic and determination of quinones and barbiturates. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 57, n. 12, p.2505-2511, out. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1386-1425\(01\)00517-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1386-1425(01)00517-0).

MEERAVALI, Noorbasha N.; KUMAR, Sunil Jai. Rapid slurry atomization using transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of cadmium, copper, manganese and lead in biological reference materials. **Journal Of Analytical Atomic Spectrometry**, [s.l.], v. 13, n. 7, p.647-652, 1998. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/a801191e>.

MERRIFIELD, John D et al. Uptake of mercury by thiol-grafted chitosan gel beads. *Water Research*, [s.l.], v. 38, n. 13, p.3132-3138, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.008>.

MIYAZAWA, Mitsuo; HISAMA, Masayoshi. Suppression of Chemical Mutagen-Induced SOS Response by Alkylphenols from Clove (*Syzygium aromaticum*) in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002umuTest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 49, n. 8, p.4019-4025, ago. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0103469>.

MOSCOSO, R.; INOSTROZA, E.; SQUELLA, J.a.. A non-conventional way to perform voltammetry. **Electrochemistry Communications**, [s.l.], v. 81, p.61-64, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2017.06.008>.

NASCIMENTO, Paulo C. do et al. Voltammetric determination of Se(IV) and Se(VI) in saline samples—Studies with seawater, hydrothermal and hemodialysis fluids. *Analytica Chimica Acta*, [s.l.], v. 648, n. 2, p.162-166, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.057>.

NEMATOLLAHI, D. et al. Electrochemical oxidation of acetaminophen in aqueous solutions: Kinetic evaluation of hydrolysis, hydroxylation and dimerization processes.

Electrochimica Acta, [s.l.], v. 54, n. 28, p.7407-7415, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2009.07.077>.

NG, Sin Yee et al. Development of a cosmetic cream certified reference material: Certification of lead, mercury and arsenic mass fractions in cosmetic cream. **International Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 389, p.59-65, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2015.08.015>.

NOVAK, Ivana; MLAKAR, Marina; KOMORSKY-LOVRIĆ, Šebojka. Voltammetry of Immobilized Particles of Cannabinoids. **Electroanalysis**, [s.l.], v. 25, n. 12, p.2631-2636, 22 nov. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201300410>.

OLIVEIRA, Tatiane Milão de et al. Direct determination of Pb in raw milk by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) with electrothermal atomization sampling from slurries. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 229, p.721-725, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.143>.

OZBEK, Nil; AKMAN, Suleyman. Determination of lead, cadmium and nickel in hennas and other hair dyes sold in Turkey. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 79, p.49-53, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.013>.

PAUL, David W.; PRAJAPATI, Indira; REED, Michelle L.. Electropolymerized eugenol: Evaluation as a protective film for oxygen sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 183, p.129-135, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.03.090>.

PÉREZ-ARANTEGUI, Josefina; CEPRIÁ, Gemma. Suitability of the voltammetry of immobilized microparticles to detect and discriminate lead compounds in microsamples of ancient black cosmetics. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 138, p.247-255, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.06.085>.

PISANO, M et al. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. *Mol Cancer*. 2007 Jan 18;6:8. DOI: 10.1186/1476-4598-6-8

PORTACCIO, M. et al. Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine–carbon black nanocomposite, for Bisphenol A detection. *Electrochimica Acta*, [s.l.], v. 109, p.340-347, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.129>.

PRAMOD, K.; ANSARI, Shahid H.; ALI, Javed. Development and validation of UV spectrophotometric method for the quantitative estimation of eugenol. *Asian Journal Of Pharmaceutical Analysis*, [s.i.], v. 3, n. 2, p.58-61, jan. 2013.

PRYOR, William A. et al. Fractionation of Aqueous Cigarette Tar Extracts: Fractions That Contain the Tar Radical Cause DNA Damage. **Chemical Research In Toxicology**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.441-448, maio 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/tx970159y>.

RAVICHANDRAN, K.; BALDWIN, R.p.. Chemically modified carbon paste electrodes. **Journal Of Electroanalytical Chemistry And Interfacial Electrochemistry**, [s.l.], v. 126, n. 1-3, p.293-300, set. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-0728\(81\)80438-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-0728(81)80438-x).

REDDY, S. Jayarama; HERMES, Michael; SCHOLZ, Fritz. The application of abrasive stripping voltammetry for a simple and rapid screening of pesticides. *Electroanalysis*, [s.l.], v. 8, n. 10, p.955-958, out. 1996. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.1140081021>.

REIS, Edson Luis Tocaia dos et al. Identificação de resíduos de disparos de armas de fogo por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 3, 409-413, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000300009>.

RODRIGUES, M. Isabel; LEMMA, A. Francisco. Planejamento de experimentos & otimização de processos 3º ed. revisada Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor., 2014.

RUBIO, Carmen et al. Exposure assessment of trace elements in fresh eggs from free-range and home-grown hens analysed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v. 69, p.45-52, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2018.02.001>.

SAĞLAM, Özlem et al. Differential pulse voltammetric determination of eugenol at a pencil graphite electrode. *Materials Science and Engineering: C*, [s.l.], v. 60, p.156-162, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.031>.

SCHOLZ, Fritz; LANGE, Birgit. Abrasive stripping voltammetry — an electrochemical solid state spectroscopy of wide applicability. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.359-367, nov. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-9936\(92\)80025-2](http://dx.doi.org/10.1016/0165-9936(92)80025-2).

SCHOLZ e MEYER. Electrochemical solid state analysis: state of the art. *Chem. Soc. Rev.* [s.i.], v. 23, p. 341–347, 2014.

SCHOLZ F, Schröder U, Gulaboski R (2015) *Electrochemistry of immobilized particles and droplets*. Springer, Berlim.

SCHOLZ, F. et al. A new procedure for fast electrochemical analysis of solid materials. *Naturwissenschaften*, [s.l.], v. 76, n. 2, p.71-72, fev. 1989. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00396709>.

SCHOLZ, F. et al. Analysis of powder mixtures with the help of abrasive stripping voltammetry and coulometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 340, n. 3, p.140-144, 1991. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00324469>.

SCHOLZ, F; Lovrić M, Stojek Z (1997) The role of redox mixed phases  $\{Ox_x(C_n red)_1-x\}$  in solid state electrochemical reactions and the effect of miscibility gaps in voltammetry. *J Solid State Electrochem*, [s.l.], V. 1 (2), p.134-142, Set. 1997 Springer DOI: 10.1007/s100080050037.

SCHULZ, Katja et al. Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the quantitative determination of the characteristic flavouring agent eugenol in serum samples after enzymatic cleavage to validate post-offence alcohol drinking claims. *Journal of Chromatography A*, [s.l.], v. 1211, n. 1-2, p.113-119, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.068>.

SCHVARTSMAN, S. *Intoxicações Agudas*. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 1985.

SEDANO, Ana Bella Alonso et al. Electrochemical study of copper and iron compounds in the solid state by using voltammetry of immobilized microparticles: application to copper ferrite characterization. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 566, n. 2, p.433-441, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2003.12.009>.

SILVA, Erika M.; TAKEUCHI, Regina M.; SANTOS, André L.. Carbon nanotubes for voltammetric determination of sulphite in some beverages. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 173, p.763-769, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.106>.

SILVA, Tiago Almeida et al. Electrochemical Biosensors Based on Nanostructured Carbon Black: A Review. *Journal of Nanomaterials*, [s.l.], v. 2017, p.1-14, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4571614>.

SILVA, Tiago Almeida e FATIBELLO-FILHO, Orlando. Square-wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of ramipril using an electrochemical sensor based on nanostructured carbon black. *Analytical Methods*, [s.l.], v. 9, n. 32, p.4680-4687, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7ay01479a>.

SIMIONI, Natália Bortolucci et al. Nanodiamonds stabilized in dihexadecyl phosphate film for electrochemical study and quantification of codeine in biological and pharmaceutical samples. **Diamond And Related Materials**, [s.l.], v. 74, p.191-196, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diamond.2017.03.007>.

SKRZYPCZAK-PIETRASZEK, Ewa et al. HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *Origanum majorana* L. shoot culture. **Phytochemistry Letters**, [s.l.], v. 20, p.443-448, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.01.009>.

SKRZYPCZYŃSKA, Katarzyna; KUŚMIEREK, Krzysztof; ŚWIĄTKOWSKI, Andrzej. Carbon paste electrodes modified with various carbonaceous materials for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by differential pulse voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, [s.l.], v. 766, p.8-15, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.01.025>.

SMITH R. M.; MARTELL, A. E. *Critical Stability Constants*. v. 6. New York: Plenum Press, 1989.

SÝS, Milan et al. Determination of vitamin E in margarines and edible oils using square wave anodic stripping voltammetry with a glassy carbon paste electrode. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 229, p.621-627, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.068>.

TAKEDA, Humberto H. et al. Differential pulse voltammetric determination of ciprofibrate in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 161, n. 1, p.755-760, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.11.028>.

TALARICO, Daria et al. Screen-printed electrode modified with carbon black and chitosan: a novel platform for acetylcholinesterase biosensor development. **Analytical**

**And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 408, n. 26, p.7299-7309, 1 jun. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9604-y>.

TASHKHOURIAN, J. et al. Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at gold nanoparticles mesoporous silica modified carbon paste electrode. *Journal Of Hazardous Materials*, [s.l.], v. 318, p.117-124, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.049>.

TESFAW, Belete et al. Quantification of lead in cooking utensils and vegetables using square wave anodic stripping voltammetry. *Heliyon*, [s.l.], 2017. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00523

TONELLO, Natalia et al. Square wave voltammetry with multivariate calibration tools for determination of eugenol, carvacrol and thymol in honey. *Talanta*, [s.l.], v. 158, p.306-314, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.071>.

TSALEV, Dimiter L. et al. Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry — advances, anticipations and reality. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, [s.l.], v. 55, n. 5, p.473-490, maio 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0584-8547\(00\)00194-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0584-8547(00)00194-4).

TSE, Tsz Wah. Hydroquinone for skin lightening: Safety profile, duration of use and when should we stop?. *Journal of Dermatological Treatment*, [s.l.], v. 21, n. 5, p.272-275, 25 jan. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/09546630903341945>.

USP. United States Pharmacopeia. (2012). vol 35. ed. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville.

VICENTINI, Fernando Campanhã et al. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film. **Sensors And Actuators B: Chemical**,

[s.l.], v. 188, p.1101-1108, nov. 2013. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.109>.

VICENTINI, Fernando Campanhã et al. Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms. *Electrochimica Acta*, [s.l.], v.157, p.125-133, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.11.204>.

VICENTINI, Fernando Campanhã et al. Pb(II) determination in natural water using a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan. *Microchemical Journal*, [s.l.], v. 116, p.191-196, set. 2014. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.05.008>.

VIEIRA, I Cruz e FATIBELLO-FILHO, Orlando. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.681-689, 31 jul. 2000. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00420-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00420-3).

WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 2. ed. Canadá: Wiley-VCH, 2000.

WANG, Joseph. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, [s.l.], v. 17, n. 1, p.7-14, jan. 2005. Wiley-Blackwell.  
<http://dx.doi.org/10.1002/elan.200403113>.

WEI, Chan et al. Simultaneous electrochemical determination of hydroquinone, catechol and resorcinol at Nafion/multi-walled carbon nanotubes/carbon dots/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 149, p.237-244, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2014.10.051>.

WEISZ, H. *Microanalysis by the Ring Oven Technique*, 2nd edn. Pergamon Press, Oxford (1970)

WILDGOOSE, Gregory g.; BANKS, Craig e.; COMPTON, Richard g.. Metal Nanoparticles and Related Materials Supported on Carbon Nanotubes: Methods and Applications. **Small**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.182-193, fev. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.200500324>.

WONG, Ademar et al. Square-wave voltammetric determination of clindamycin using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and gold nanoparticles within a crosslinked chitosan film. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 231, p.183-193, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.03.014>.

WONG, Ademar; SANTOS, Anderson Martin; FATIBELLO-FILHO, Orlando. Simultaneous determination of paracetamol and levofloxacin using a glassy carbon electrode modified with carbon black, silver nanoparticles and PEDOT: PSS film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 255, p.2264-2273, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.020>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Evaluation of certain food additives and contaminants, Twenty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, 683, 1982 (Geneva, Switzerland)

XU, Lei. Simple Electrochemical Sensor Based on Carbon-black Paste Electrode Coupled with Derivative Square Wave Voltammetry for the Determination of Sulfites in Rice Wine. **International Journal Of Electrochemical Science**, [s.l.], p.4586-4597, jun. 2016. ESG. <http://dx.doi.org/10.20964/2016.06.43>.

YANG, Lite; ZHAO, Faqiong; ZENG, Baizhao. Electrochemical determination of eugenol using a three-dimensional molecularly imprinted poly (p-aminothiophenol-co-p-aminobenzoic acids) film modified electrode. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 210, p.293-300, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.05.167>.

YAO, Shaojun et al. A highly sensitive hydrogen peroxide amperometric sensor based on MnO<sub>2</sub> nanoparticles and dihexadecyl hydrogen phosphate composite film. **Analytica**

**Chimica Acta**, [s.l.], v. 557, n. 1-2, p.78-84, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.052>.

YEDOMON, Brice et al. Biomonitoring of 29 trace elements in whole blood from inhabitants of Cotonou (Benin) by ICP-MS. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, [s.l.], v. 43, p.38-45, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.11.004>.

YILDIZ, Gulcema et al. Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis. *Talanta*, [s.l.], v. 173, p.1-8, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.056>.

YIN, Huanshun et al. Electrochemical behavior of catechol, resorcinol and hydroquinone at graphene–chitosan composite film modified glassy carbon electrode and their simultaneous determination in water samples. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 56, n. 6, p.2748-2753, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2010.12.060>.

YOSHIMURA, Kotaro et al. Effects of all-trans retinoic acid on melanogenesis in pigmented skin equivalents and monolayer culture of melanocytes. *Journal of Dermatological Science*, [s.l.], v. 27, p.68-75, ago. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0923-1811\(01\)00116-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0923-1811(01)00116-5).

ZHANG, Yanli et al. Simultaneous electrochemical determination of catechol and hydroquinone based on graphene–TiO<sub>2</sub> nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 204, p.102-108, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.07.078>.

ZHANG, Hongshu; BO, Xiangjie; GUO, Liping. Electrochemical preparation of porous graphene and its electrochemical application in the simultaneous determination of hydroquinone, catechol, and resorcinol. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 220, p.919-926, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.035>.

ZHAO, Guo et al. Sensitive stripping voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) by a Bi/multi-walled carbon nanotube-emeraldine base polyaniline-Nafion composite modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 220, p.267-275, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.10.059>.

ZHU, Lian et al. Simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) using square wave anodic stripping voltammetry at a gold nanoparticle-graphene-cysteine composite modified bismuth film electrode. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 115, p.471-477, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.209>.

ZIYATDINOVA, Guzel\* et al, Voltammetric sensing and quantification of eugenol using nonionic surfactant self-organized media. *Analytical Methods*, [s.l.], jun DOI: 10.1039/c3ay40693h.

ZOSKI CG (2007) Handbook of Electrochemistry. Elsevier