



RAFAEL MACHADO FELIX DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ELETROANALÍTICA DE TRICAÍNA EM
PEIXES (*Oreochromis niloticus*)**

LAVRAS – MG

2014

RAFAEL MACHADO FELIX DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ELETROANALÍTICA DE
TRICAÍNA EM PEIXES (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

**LAVRAS – MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lima, Rafael Machado Felix de.

Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica de tricaína em
peixes (*Oreochromis niloticus*) / Rafael Machado Felix de Lima. –
Lavras: UFLA, 2014.

106 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Adelir Aparecida Saczk.

Bibliografia.

1. Anestésico. 2. Extração. 3. Técnicas eletroquímicas. 4.
Piscicultura. 5. Tilápia do Nilo. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 543

RAFAEL MACHADO FELIX DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ELETROANALÍTICA DE
TRICAÍNA EM PEIXES (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014.

Dra. Luciana Simionatto Guinesi ASMEC

Dr. Daniel Okamura UFLA

Dra. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

**LAVRAS – MG
2014**

A Deus, pela oportunidade de renascer e percorrer este caminho.
Aos meus pais, Geraldo e Josiane, pelo amor e carinho, ensinamentos e
incentivos, durante toda minha vida.
Aos meus avós, pelo amor e carinho. Em especial, ao meu avô Eurico, pelos
ensinamentos e por fazer parte do homem que sou.
Ao meu irmão, Diego, pelos conselhos, apoio e amizade.
À minha sobrinha, Laura, pelo sorriso mais acolhedor.
À minha cunhada, Letícia, pelo amor e carinho.
À minha namorada, Cibele, pelo amor, companherismo e compreensão.
À minha orientadora, Adelir, pelos conselhos, incentivo, orientação, paciência e
amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça de ser, estar e amar. Pela honra de ser seu filho, pelo que tenho e o que sou, por me carregar em seu colo durante toda esta etapa e, ainda, por sorrir comigo, durante a vitória. A Jesus Cristo, pelos ensinamentos e lições a serem vivenciadas diariamente e, ainda, aos amigos espirituais, pelo apoio nesta jornada, a vida.

Aos meus pais, pela graça de ser seu filho, pelos ensinamentos transmitidos, pelo constante apoio, amor e amizade, e, ainda mais, por sempre estarem presentes durante toda minha vida, me protegendo das quedas e me ensinando a levantar dos tropeços da vida, pelo amor inesgotável, e pelo carinho acolhedor.

Ao meu irmão, Diego, pelo carinho, amor e amizade, por ser conselheiro nas horas em que mais precisei, por ser leal em todas suas atitudes, pelo seu senso de justiça inesgotável e, principalmente, pela graça de compartilhar contigo minhas alegrias e sofrimentos.

Aos meus avós Luzia, Maria de Lourdes, João e Eurico, por serem tão especiais e conduzirem meus pais a se tornarem pessoas presentes em minha vida e pela graça de chamá-los de avô e avó, mesmo que por pouco tempo. O amor nunca se esgota.

Em especial, ao meu avô Eurico, pela presença, amor e carinho. Pelos ensinamentos e oportunidade de convivência. Por ser parte do homem que me tornei e, principalmente, pela compreensão, paciência e dedicação. Ainda não sou doutor como sonhou, mas estou a caminho.

À minha sobrinha, pelo sorriso, carinho e conforto. Pela paz.

À minha cunhada, por ser mais que uma irmã, estando presente sempre que precisei. Pela amizade de irmãos.

À minha namorada, Cibele, por estar presente a cada minuto em que precisei, me incentivando, me fazendo feliz nos momentos mais difíceis, por ser a pessoa tão especial que Deus colocou em minha vida. Também pelos finais de semana acompanhando o trabalho de laboratório e dedicando seu tempo a mim, e pelo amor e carinho.

Ao professor Valdomiro, pelo incentivo, amizade e apoio, acreditando sempre em meu potencial, e pela orientação e por me fazer descobrir o mundo da pesquisa.

Ao professor Luiz Carlos, pelo apoio e prontidão ao me conduzir na descoberta de um novo lugar, a UFLA.

Aos amigos, que sempre estiveram presentes durante a minha jornada, por sempre serem tão importantes em minha vida, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

Em especial, a minha querida amiga Cybele, pela compreensão, quando se fez necessária, pelo carinho, pelos conselhos e palavras de calma nas horas em que mais precisei, por acreditar que seu amigo seria capaz de empreender uma descoberta de um novo horizonte e por ser a minha melhor amiga.

Aos familiares, pela força e amor.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade de realizar o mestrado.

À minha orientadora, Adelir, pela orientação e amizade, pelo carinho, pelos conselhos e, principalmente, por fazer parte desta jornada, auxiliando-me sempre e me fazendo ver mais longe, tornando possível a realização deste sonho.

À professora Zuy, pelo carinho e amizade.

À professora Luciana, pela disponibilidade e carinho, por fazer parte de minha vida, contribuindo para a realização deste sonho, e pela avaliação do presente trabalho.

Ao Dr. Daniel, pela disponibilidade e prontidão em aceitar meu convite para a avaliação do trabalho, por todas as contribuições para a execução do mesmo.

Aos demais professores do Departamento de Química com quem convivi durante o mestrado, por serem exemplos de profissionais competentes.

Aos amigos do Laboratório de Analítica e Eletroanalítica, Bianca, Thallis, Meryene, Maísa, Elisângela, Jéssica e Michele, por terem contribuído com apoio e amizade para a realização do presente trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos.

Aos amigos do Laboratório de Catálise e Biocombustíveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica.

Ao Laboratório de Bioquímica, pelo empréstimo de equipamento para as extrações.

À Shirley, pela ajuda e disponibilidade.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e facilitaram a minha caminhada, meus sinceros agradecimentos.

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim
devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos;
lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”*

Paulo Baleki

RESUMO

Durante o processo de produção, alguns alimentos podem ser expostos a agentes químicos contaminantes, representando um risco à saúde humana. Na aquicultura há uma grande diversidade de drogas, dentre elas os anestésicos, que são utilizados para insensibilizar os peixes e reduzir o estresse animal. Porém, o processo de anestesia pode proporcionar traços residuais, contaminando o pescado. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de protocolos analíticos que possibilitem a detecção rápida, prática e precisa desses anestésicos no filé do pescado. As técnicas eletroquímicas representam uma importante fonte de pesquisa, uma vez que oferecem baixo custo, com sensibilidade e seletividade, além de apresentarem a possibilidade de serem transportadas para sistemas portáteis. Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver uma metodologia para a determinação de tricafina em filés de peixes, por meio das técnicas eletroquímicas. Foram utilizadas as modalidades cíclica, varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada para o desenvolvimento da metodologia. A tricafina apresentou um comportamento de oxidação irreversível, com dois picos anódicos em potencial de 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II). O processo de transferência de massa foi controlado por difusão com ocorrência de reações químicas sem complicações cinéticas. A melhor relação da intensidade de corrente de pico anódico e largura de pico à meia altura foi obtida com a modalidade pulso diferencial. O método eletroquímico desenvolvido apresentou limites de detecção de $2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de quantificação de $8,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foram realizados dois métodos de extração da tricafina no filé de peixe e o método I apresentou maior eficiência, com recuperação de 106,13%.

Palavras-chave: Anestésico. Extração. Técnicas eletroquímicas. Piscicultura. Tilápia do Nilo.

ABSTRACT

During the production process, some foods can be exposed to chemical agents contaminants, presenting a risk to human health. In aquaculture there is a great variety of drugs, among them, anesthetics which are used to desensitize the fish and reduce animal stress. However the anesthesia process can provide residual traces, contaminating the fish. Thus, it is necessary to develop protocols that enable the rapid, practical and accurate detection of these anesthetics in the fish fillet. Electrochemical techniques represent an important source of research, as they offer low-cost, sensitivity and selectivity, in addition having the possibility to be transported to portable systems. Thus, the goal of the present work was to develop a methodology for the tricaine determination in fish fillets by means of electrochemical techniques. For the methodology development were used the cyclic modes, linear sweep, differential pulse and square wave. The tricaine presented an irreversible oxidation behavior with two anodic peak in potential of 0.8 V (peak I) and 1.3 V (peak II). The mass transfer process was controlled by diffusion with occurring chemical reactions without complications. The best ratio of current intensity of the anodic peak and peak width at half height was obtained by differential pulse mode. The electrochemical method developed showed a detection limit of $2.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ and quantification $8.2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Two methods of tricaine extraction in fish fillet were made, the method I showed more efficient with recovery of 106.13%.

Keywords: Anesthetic. Extraction. Electrochemical techniques. Pisciculture. Nile tilapia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas químicas de anestésicos utilizados na aquicultura contendo (a) função éster e (b) função amida, em que R1 e/ou R2 são grupos amina.....	26
Figura 2	Estruturas químicas da (a) benzocaína, do (b) ácido p-aminobenzoico e da (c) tricaína.....	28
Figura 3	Sistema eletroquímico contendo um bipotenciostato/galvanostato (a), célula eletroquímica com arranjo de três eletrodos: trabalho, auxiliar ou contra-eletrodo e referência (b) e um microcomputador (c).....	31
Figura 4	Forma triangular de excitação, varredura de potencial E com tempo t na forma de um ciclo em voltametria cíclica.....	32
Figura 5	Forma linear da aplicação do potencial E com tempo t e o padrão de resposta obtida em voltametria de varredura linear.....	33
Figura 6	Forma de excitação em pulso de aplicação do potencial E em função do tempo t e o padrão de resposta gaussiano em voltametria de pulso diferencial.....	34
Figura 7	Forma de excitação em pulso de aplicação de potencial E em função do tempo t e o padrão de resposta em voltametria de onda quadrada.....	35
Figura 8	Voltamogramas cíclicos de solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$	48
Figura 9	Voltamogramas cíclicos da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ m, durante a varredura sucessiva de potencial, durante dez ciclos, $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$	49
Figura 10	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes v (5 a 400 mV s^{-1}), utilizando voltametria cíclica.....	51
Figura 11	Voltamogramas na modalidade DPV para a leitura de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sem o tempo de imersão e com 40 minutos de imersão.....	56
Figura 12	Mecanismo de oxidação de uma solução de tricaína $3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, segundo os resultados experimentais usando voltametria cíclica....	59

Figura 13	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes v (5 a 500 mV s^{-1}), utilizando a modalidade LSV.....	60
Figura 14	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes v (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando voltametria pulso diferencial, $A_p = 75 \text{ mV s}^{-1}$, t_p ms e $I_p = 5 \text{ mV}$...	63
Figura 15	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes A_p (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando voltametria de pulso diferencial, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 10\text{ms}$ e $I_p = 5 \text{ mV}$	66
Figura 16	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes t_p (2 a 70 ms), utilizando voltametria de pulso diferencial, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $I_p = 5 \text{ mV}$	69
Figura 17	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes I_p (1 a 50V), utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 2 \text{ ms}$	72
Figura 18	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes A_p (5 a 150 mV s^{-1}), utilizando voltametria de onda quadrada, $f = 10\text{Hz}$ e $I_p = 5\text{mV}$	75
Figura 19	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes f (5 a 75 Hz), utilizando SWV, $I_p = 5\text{mV}$ e $A_p = 75\text{mV s}^{-1}$	77
Figura 20	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes I_p (1 a 20 V), utilizando SWV, $A_p = 75 \text{ mV s}^{-1}$ e $f = 50 \text{ Hz}$	80
Figura 21	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes E_d (+0,8V a -1,4V), utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$ e $I_p = 20 \text{ V}$	84
Figura 22	Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes t_d (30 a 240s), utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$ e $E_d = - 0,6\text{V}$	87
Figura 23	Voltamogramas de adições sucessivas de solução de tricaína em diferentes concentrações (20 a $90 \mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$	91
Figura 24	Voltamogramas da solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência e na presença de 1 mL do extrato de filé de peixe obtido pelo métodos I e II, utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$	93

- Figura 25 Voltamogramas da solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de 1 mL do extrato de filé de peixe obtido pelo método I, em diferentes concentrações de tricaína, utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$ 94
- Figura 26 Voltamogramas da solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de 1 mL do extrato de filé de peixe obtido pelo método II, em diferentes concentrações de tricaína, utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$ 95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v (5 a 400 mV s^{-1}) para o pico I, usando a voltametria cíclica	51
Gráfico 2	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v (5 a 400 mV s^{-1}) para o pico II, usando a voltametria cíclica	52
Gráfico 3	Variação de I_{pa} de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da $v^{1/2}$ para o pico I, usando voltametria cíclica	52
Gráfico 4	Variação de I_{pa} de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da $v^{1/2}$ para o pico II, usando voltametria cíclica	53
Gráfico 5	Variação de $I_{pa}/v^{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v para o pico I	54
Gráfico 6	Variação de $I_{pa}/v^{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v para o pico II	54
Gráfico 7	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da v (5 a 500 mV s^{-1}), utilizando LSV, para o pico I	61
Gráfico 8	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da v (5 a 500 mV s^{-1}), utilizando LSV, para o pico II	61
Gráfico 9	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em função da v (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando DPV, para o pico I	64
Gráfico 10	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em função da v (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando DPV, para o pico II	64
Gráfico 11	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da variação de A_p (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando DPV, para o pico I. ...	67

Gráfico 12	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da variação de A_p ($5 \text{ a } 300 \text{ mV s}^{-1}$) utilizando DPV, para o pico II	67
Gráfico 13	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_p ($2 \text{ a } 70 \text{ ms}$), utilizando DPV, para o pico I.....	70
Gráfico 14	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_p ($2 \text{ a } 70 \text{ ms}$) utilizando DPV, para o pico II.....	70
Gráfico 15	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p ($1 \text{ a } 50 \text{ V}$) utilizando DPV, para o pico I.....	73
Gráfico 16	Figura 34. Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p ($1 \text{ a } 50 \text{ V}$) utilizando DPV, para o pico II.....	73
Gráfico 17	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de A_p ($5 \text{ a } 150 \text{ mV s}^{-1}$), utilizando SWV, para o pico I.....	76
Gráfico 18	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de A_p ($5 \text{ a } 150 \text{ mV s}^{-1}$), utilizando SWV, para o pico II.....	76
Gráfico 19	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de f ($5 \text{ a } 75 \text{ Hz}$) utilizando SWV, para o pico I.....	78
Gráfico 20	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de f ($5 \text{ a } 75 \text{ Hz}$), utilizando SWV, para o pico II.....	79
Gráfico 21	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p ($1 \text{ a } 20 \text{ V}$) utilizando SWV, para o pico I.....	81
Gráfico 22	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p ($1 \text{ a } 20 \text{ V}$) utilizando SWV, para o pico II.....	81
Gráfico 23	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de E_p ($+0,8 \text{ V a } -1,4 \text{ V}$), utilizando DPV, para o pico I.....	85
Gráfico 24	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de E_p ($+0,8 \text{ V a } -1,4 \text{ V}$), utilizando DPV, para o pico II.....	85
Gráfico 25	Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_d ($30 \text{ a } 240 \text{ s}$), utilizando DPV, para o pico I.....	88

Gráfico 26 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_d (30 a 240s), utilizando DPV, para o pico II..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resposta voltamétrica da tricaína em diferentes eletrólitos de suporte.....	46
Tabela 2	Principais parâmetros voltamétricos da oxidação dos picos I e II na modalidade cíclica	57
Tabela 3	Comparação entre as modalidades varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada	83
Tabela 4	Comparação de I_{pa} na presença e na ausência da pré-concentração ..	90
Tabela 5	Parâmetros analíticos obtidos pela variação de I_{pa} em função de diferentes concentrações de tricaína na modalidade DPV	91
Tabela 6	Ensaio de recuperação dos métodos de extração I e II da tricaína..	96

LISTA DE ABREVIATURAS

I_{pa}	Intensidade de corrente de pico anódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
v	Velocidade de varredura
A_p	Amplitude de pulso
t_p	Tempo de pulso
I_p	Incremento de varredura
$W_{1/2}$	Largura de pico à meia altura
F	Frequência
E_d	Potencial de depósito
t_d	Tempo de depósito
Ag/AgCl	Eletrodo de prata cloreto de prata
CV	Coefficiente de variação
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1	Segurança alimentar	23
3.2	Piscicultura	23
3.4	Anestésicos	25
3.4.1	Tricaína	27
3.5	Métodos voltamétricos	29
3.5.1	Voltametria cíclica	31
3.5.2	Voltametria de varredura linear	32
3.5.3.1	Voltametria de pulso diferencial	33
3.5.3.2	Voltametria de onda quadrada	34
3.6	Análise residual de anestésicos utilizando métodos eletroanalíticos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Reagentes e soluções	38
4.2	Estudos voltamétricos	38
4.2.1	Comportamento eletroquímico da tricaína por voltametria cíclica	38
4.2.2	Estudo do transporte de massa	39
4.2.3	Otimização dos parâmetros da voltametria de varredura linear ...	39
4.2.4	Otimização dos parâmetros de pulso diferencial	40
4.2.5	Otimização dos parâmetros de onda quadrada	40
4.2.6	Estudo de pré-concentração	40
4.2.7	Curva analítica	41
4.3	Análise da tricaína em extratos de filé de peixe	41
4.3.1	Reagentes e soluções	41
4.3.2	Obtenção dos extratos	42
4.3.3	Análise de interferentes na matriz	43
4.2.4	Quantificação da tricaína utilizando voltametria de pulso diferencial	44
4.2.5	Ensaio de recuperação	44
4.3	Instrumentação eletroquímica	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Estudo do eletrólito de suporte	46

5.2	Comportamento eletroquímico da tricaína	47
5.2.1	Influência da velocidade de varredura de potencial usando voltametria cíclica	50
5.2.2	Processo de transporte de massa da tricaína.....	55
5.3	Mecanismo de oxidação da tricaína.....	58
5.4	Voltametria de varredura linear	60
5.4.1	Influência da velocidade de varredura de potencial da tricaína.....	60
5.5	Voltametria de pulso diferencial.....	62
5.5.1	Influência da velocidade de varredura.....	62
5.5.2	Influência da amplitude de pulso.....	65
5.5.3	Influência do tempo de pulso.....	68
5.5.4	Influência do incremento de varredura.....	71
5.5.5	Otimização de parâmetros da voltametria de pulso diferencial	74
5.6	Voltametria de onda quadrada.....	74
5.6.1	Influência da amplitude de pulso.....	74
5.6.2	Influência da frequência	77
5.6.3	Influência do incremento de varredura.....	79
5.6.4	Otimização de parâmetros da voltametria de onda quadrada	82
5.7	Comparação entre as modalidades voltamétricas.....	82
5.8	Estudo de pré-concentração na modalidade pulso diferencial	83
5.8.1	Influência do potencial de depósito	84
5.8.2	Influência do tempo de depósito	86
5.8.3	Otimização de parâmetros da pré-concentração da tricaína na modalidade DPV	89
5.9	Análise da tricaína na ausência de matriz.....	90
5.10	Análise de tricaína nos extratos de filé de peixe.....	92
5.11	Ensaio de recuperação.....	96
6	CONCLUSÃO.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98
	ANEXOS	106

1 INTRODUÇÃO

A segurança alimentar é um assunto tratado, na atualidade, com crescentes pesquisas. Isso se deve ao fato de que alguns alimentos podem ser expostos a processos químicos durante o processamento e, subsequentemente, apresentar resquícios, representando risco para a saúde humana. Tais alimentos, segundo legislações nacionais e internacionais e, ainda, algumas organizações, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), não devem conter vestígios de qualquer substância utilizada durante a produção do alimento, para não comprometer a saúde humana. Estes compostos podem deixar traços residuais na carne do peixe. Assim, é necessário desenvolver metodologias para a quantificação desses compostos para a análise residual, definindo margens seguras para o consumo humano e aumentando a qualidade do pescado brasileiro para a exportação.

A produção de tilápia no Brasil se estende por todo o território nacional e é a espécie mais produzida, alcançando a 17^a posição mundial na produção de pescado, havendo a necessidade constante de melhoramento do manejo aquícola.

Para facilitar o manuseio aquícola da cadeia produtiva do pescado, frequentemente são utilizados compostos químicos, como vacinas, antibióticos e anestésicos, com o propósito de diminuir o estresse e/ou os estímulos dolorosos a que esses animais estão expostos. Porém, o uso destes compostos pode deixar traços residuais na carne do peixe, diminuindo a qualidade do alimento.

A análise residual de compostos anestésicos em peixes é uma ferramenta importante para a definição de protocolos que envolvam desde os parâmetros de aplicação de anestésicos até o abate e o processamento final do pescado, melhorando a qualidade do produto final.

Os anestésicos mais utilizados na aquicultura são a triclaína, a benzocaína e o óleo de cravo, e, ainda, há alguns relatos da utilização de

isoeugenol, mentol, quinaldina e metomidato. A tricaína (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222), um éster derivado do ácido p-aminobenzoico, foi sintetizada devido à insolubilidade da benzocaína.

Usualmente, as técnicas de análises utilizadas na detecção de anestésicos são as cromatográficas. As técnicas eletroquímicas representam uma alternativa, uma vez que oferecem alta sensibilidade e seletividade, quando comparadas com as técnicas cromatográficas, além da possibilidade de serem transportadas para sistemas portáteis e de baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver uma metodologia eletroquímica para a detecção e a quantificação do anestésico tricaína em peixe (*Oreochromis niloticus*).

2.2 Objetivos específicos

- a) estudar o comportamento eletroquímico do anestésico tricaína frente ao eletrodo de carbono vítreo, analisando os potenciais nos quais esta substância mostra sensibilidade;
- b) desenvolver uma metodologia analítica para a determinação do anestésico tricaína, empregando as técnicas eletroquímicas nas modalidades de voltametria de varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada;
- c) investigar a eficiência de recuperação da tricaína por meio de diferentes procedimentos de preparo da amostra (preparo, extração e pré-concentração);
- d) aplicar a metodologia eletroquímica desenvolvida para a determinação e a quantificação do anestésico tricaína em filé de peixes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Segurança alimentar

O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) fiscaliza, investiga e realiza auditorias para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009). A Lei nº 11.958, de 26/06/2009, criou o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), que passou a ter autonomia e responsabilidade sobre o setor aquícola, utilizando o carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) para monitorar a qualidade do pescado (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2012). O produto final deve estar isento de qualquer contaminação, garantindo a sua qualidade final na mesa do consumidor (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS ou World Health Organization, WHO) monitora todo o processo de produção, garantindo a segurança alimentar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Este tema tem se tornado fonte de pesquisa crescente, uma vez que a saúde pública está diretamente ligada ao consumo alimentar (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, 2013).

3.2 Piscicultura

No Brasil, atualmente, são produzidas cerca de 1,25 milhões de toneladas de peixe, gerando um PIB de cerca de R\$ 5 bilhões, e o país ocupa a 19ª posição mundial de produção de pescado, com maior produção nos estados

de Santa Catarina, Pará e Maranhão (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014).

Dentre as espécies produzidas no Brasil é possível destacar a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), que tem maior consumo e produção. A tilápia foi introduzida no país em 1952, com a espécie *T. rendalli*. Este peixe de água doce pertence à família Cichlidae, originária de rios que banham a África, a Jordânia e a Palestina, podendo, ainda, se reproduzir e viver em oceanos. Sua produção foi iniciada em meados de 1971, intensificando-se a cada ano e, em 2011, atingiu 9.681,6 toneladas (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2008; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014).

O conhecimento das cadeias produtivas é importante para a qualidade das medidas de ordenação e manejo. Na cadeia produtiva do pescado é possível destacar a aquicultura e a pesca extrativa. A aquicultura se caracteriza como o cultivo de animais aquáticos em ambientes monitorados e similares ao seu habitat natural e a pesca extrativa é caracterizada como a captura desses animais em seu habitat (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2014).

Assim, a aquicultura é uma atividade marcada por intenso manuseio dos animais. É evidente que operações de transporte, marcação e coleta de sangue possam acarretar contaminação desses animais por agentes químicos, como antibióticos, vacinas e anestésicos. Dentre os agentes químicos, os anestésicos são os mais utilizados na piscicultura. São drogas importantes que insensibilizam os peixes, minimizando os efeitos danosos do estresse imposto durante o manejo dos animais (ACERETE et al., 2004; FRISCH; ANDERSON, 2000; MYLONAS et al., 2005; RUANE; CARBALLO; KOMEN, 2002; ROSS; ROSS, 2008; VERA et al., 2010; METTAM et al., 2011; SNEDDON, 2009).

Diante do manejo aquícola, o uso de anestésicos se torna importante, visto que diminui substancialmente as atividades fisiológicas do peixe, facilitando o manuseio. Além disso, em pesquisas recentes há relatos de que os peixes sentem estímulos dolorosos, devido às ligações entre as suas atividades comportamentais e os neurotransmissores cerebrais específicos (SNEDDON, 2009; SNEDDON, 2012).

Os anestésicos podem ser administrados por ingestão, utilizando-se o alimento como condutor de substâncias, injeção, por meio da aplicação direta ou, ainda, por imersão em soluções contendo a substância, sendo este método o menos eficiente devido à solubilidade de determinados compostos (SUN et al., 2010).

Esses medicamentos foram inicialmente utilizados há mais de 40 anos, em algumas espécies de peixes. A partir de então, buscam-se o melhoramento destas substâncias e métodos mais efetivos para a anestesia (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004). Os anestésicos mais utilizados na aquicultura são tricafina, benzocaína e óleo de cravo, e há relatos, na literatura, do uso de outros compostos, como isoeugenol, mentol, quinaldina e metomidato (KIESSLING et al., 2009; CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2005; ZAHL; SAMUELSEN; KIESSLING, 2012).

3.4 Anestésicos

Os primeiros relatos do uso da anestesia foram feitos no século XIII, tendo sido pesquisada por Raimundo Lúlio, utilizando éter como componente principal (MASSONE, 2008). Em toda anestesia ocorre uma sedação primária e, em seguida, uma diminuição progressiva das funções fisiológicas. Os anestésicos locais diminuem os estímulos dolorosos, enquanto a anestesia geral diminui os níveis de consciência (WEBER et al., 2009; WEBER et al., 2011).

Em peixes são utilizados anestésicos locais, visto que estes animais têm respiração branquial, a qual possibilita uma rápida absorção dessas drogas, com ação sistêmica. Em comparação aos mamíferos, esta anestesia atua de forma análoga à anestesia geral. Entretanto, essas drogas são rapidamente metabolizadas, sendo eliminadas do organismo com maior velocidade do que a anestesia geral. Dessa forma, ao definir o tempo de carência do anestésico, é possível determinar níveis seguros para o consumo da carne do pescado (KIESSLING et al., 2009).

A estrutura química da molécula de anestésico é composta por uma função aromática, uma cadeia intermediária de éster (Figura 1a) ou, uma função amida (Figura 1b) e, ainda, um grupo amina secundário ou terciário (ARAÚJO; PAULA; FRACETO, 2008).

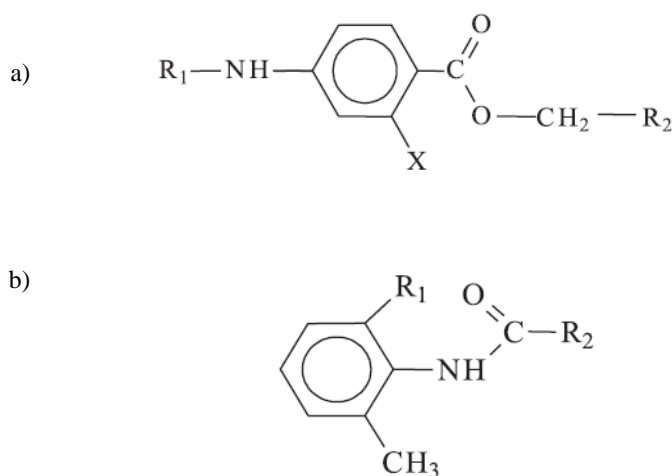


Figura 1 Estruturas químicas de anestésicos utilizados na aquicultura contendo (a) função éster e (b) função amida, em que R1 e/ou R2 são grupos amina

Outro fator importante e determinante para a execução das atividades fisiológicas no organismo animal são os grupamentos em R₁ e/ou R₂, que podem conferir caráter anfifílico, determinando a solubilidade do composto.

Entre os anestésicos disponíveis no mercado, é possível destacar a tricaína. Este composto é solúvel em água e aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, para utilização nas espécies de peixes que pertencem às famílias Ictaluridae, Salmonidae, Esocidae e Percidae. Nos últimos anos, a tricaína vem sendo estudada em relação à sua eficiência no pescado e ao seu tempo de carência no filé do peixe.

3.4.1 Tricaína

Dentre os anestésicos utilizados na aquicultura é possível destacar a benzocaína e a tricaína, pela similaridade entre suas estruturas químicas.

A benzocaína (4-aminobenzoato de etila) tem massa molecular de 165,19 g mol⁻¹, solubilidade em água de 0,4 g L⁻¹ (25 °C) e temperatura de fusão de 89-92 °C. Já a tricaína (metanosulfonato 3-aminobenzoato de etila, MS-222) tem massa molecular de 261,29 g mol⁻¹, solubilidade em água de 1x10⁵ mg L⁻¹ (25 °C) e temperatura de fusão de 149,5 °C.

O precursor da benzocaína (Figura a) e da tricaína é o ácido p-aminobenzoico (Figura 2b). A benzocaína é um anestésico local insolúvel em água, o que inviabiliza algumas utilizações em meio aquoso, porém, é amplamente utilizada durante alguns procedimentos farmacêuticos, no tratamento veterinário e nos procedimentos voltados para a saúde humana. Diante da insolubilidade da benzocaína foi necessário o desenvolvimento de outro composto, sendo a tricaína (Figura 2c), com alta solubilidade em água, amplamente comercializada (STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 2000).

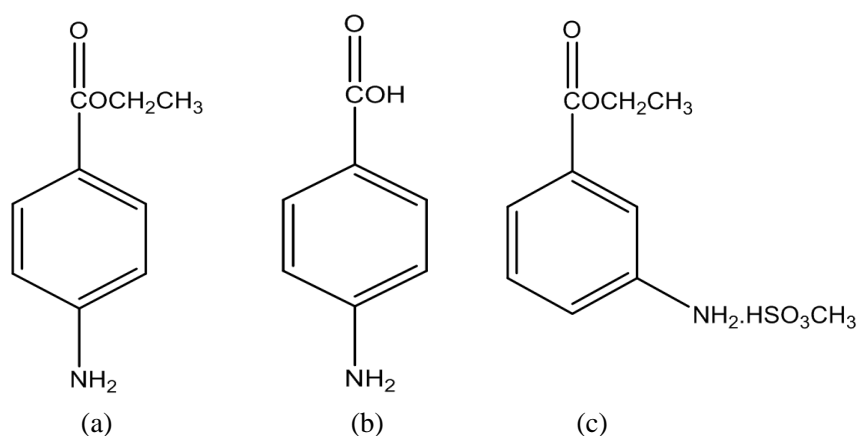


Figura 2 Estruturas químicas da (a) benzocaína, do (b) ácido p-aminobenzoico e da (c) tricaina

A tricaina é o único anestésico aprovado pela FDA/EUA, para a utilização nas espécies de peixes que pertencem às famílias Ictaluridae, Salmonidae, Esocidae e Percidae (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013).

Davis et al. (2008) realizaram estudos sobre a influência da tricaina na pele e nas córneas da tilápia e verificaram que, quando este anestésico é utilizado em pH alcalino, ocasiona danos a estes órgãos dos peixes, no entanto, não apresentou potencial genotóxico.

Em relação aos métodos de extração e caracterização da tricaina, é possível ressaltar o estudo proposto por Scherpenisse e Bergwerff (2007), que realizaram a determinação de resíduo anestésico de tricaina em filé de peixe, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (LC/MS). As extrações do anestésico foram realizadas utilizando-se ultrassom com a adição de uma mistura de solução tampão/metanol. Uma parcela da amostra foi fortificada com benzocaína (padrão interno) e, cerca de 15 minutos depois, colocada em 5 mL de solução tampão:metanol (50:50 v/v) e

levada a um agitador. Após este procedimento, o extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi reservado. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Diante dos estudos envolvendo a segurança alimentar, a análise da triclaína no filé de peixe se torna uma ferramenta importante para a avaliação da eficiência deste anestésico. Atualmente, não existem protocolos desenvolvidos que determinem limites aceitáveis da presença destes compostos no filé de peixe.

3.5 Métodos voltamétricos

A voltametria foi desenvolvida a partir da polarografia, tendo sido descoberta em 1922, pelo químico Jaroslav Heyrovsky. Esta técnica faz parte de um grupo de métodos eletroquímicos nos quais as medidas são realizadas a fim de obter informações a respeito do analito. Tem como fundamento os fenômenos físico-químicos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução. As medidas são realizadas por meio da corrente elétrica resultante entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, em função da diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, gerando um voltamograma no qual a corrente é considerada proporcional à concentração do analito (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PACHECO et. al., 2013).

Na voltametria é possível obter dois tipos de correntes, a faradáica e a não faradáica. Nas correntes faradáicas, ocorre uma transferência de elétrons em um eletrodo, sem impedimento, sendo denominados processos faradaicos, pois, são realizados seguindo a lei de Faraday, em que a reação química é proporcional à corrente. Na corrente não faradáica, também chamada de capacitiva, esta corrente não é proporcional à concentração da amostra e, portanto, não segue a lei estabelecida por Faraday. Sua ocorrência se deve ao

acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, aumentando a carga da dupla camada elétrica (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; PACHECO et al., 2013)

A voltametria é controlada por três processos de transferência de massa que são a migração (atração ou repulsão entre as espécies iônicas presentes na solução e o eletrodo de trabalho), a convecção (movimentação das espécies causada por uma perturbação no sistema) e a difusão (movimentação espontânea da espécie química). Em geral, para os processos voltamétricos, é necessária a eliminação da migração e da convecção, sendo o primeiro processo eliminado por meio da adição de eletrólito de suporte cem vezes mais concentrado que a amostra e o segundo, retirando-se a agitação, deixando a solução em repouso. Dessa forma, os processos de transporte de massa serão realizados exclusivamente por meio da difusão, salvo casos em que o processo é controlado por adsorção, sendo este o quarto tipo de controle de massa para sistemas voltamétricos (BARD; FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

Em relação à instrumentação, são utilizados um potenciostato/galvanostato (Figura 3a), responsável pela aplicação do potencial externo e uma célula eletroquímica de capacidade variável com um sistema de três eletrodos (Figura 3b) que são: trabalho (no qual o potencial varia linearmente com o tempo), auxiliar (realiza o transporte de corrente entre o potenciostato e o eletrodo de trabalho) e referência (em que o potencial não se altera durante o processo eletroquímico). Para o tratamento dos dados, é utilizado um microcomputador interfaceado por um programa específico para as análises voltamétricas (Figura 3c) (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

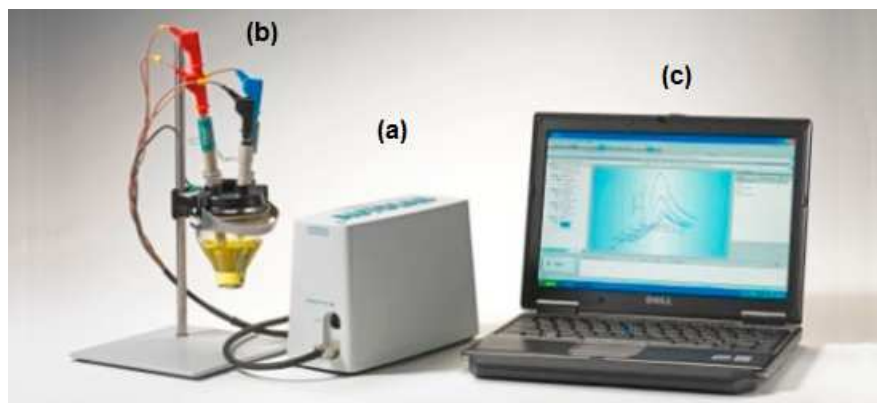


Figura 3 Sistema eletroquímico contendo um bipotenciostato/galvanostato (a), célula eletroquímica com arranjo de três eletrodos: trabalho, auxiliar ou contra-eletrodo e referência (b) e um microcomputador (c)

As técnicas voltamétricas podem ser divididas nas modalidades cíclica, varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada.

3.5.1 Voltametria cíclica

Esta modalidade permite que o analista adquira informações qualitativas sobre a amostra, ou seja, permite analisar as reações eletroquímicas envolvidas durante a aplicação do potencial. Ainda é possível a coleta de mais informações sobre a amostra, como os parâmetros termodinâmicos de processos redox, a cinética de reações heterogêneas de transferências de elétrons, as reações químicas acopladas ou os processos adsortivos (WANG, 2006; PACHECO et al., 2013).

Os parâmetros utilizados como variáveis desta modalidade incluem a intensidade de corrente de pico (I_p), a velocidade de varredura de potencial (v) e os potenciais de pico (E_p). Com estas variáveis é possível identificar os processos eletroquímicos e utilizá-los como critérios de diagnósticos de diversos

processos que ocorrem na interface eletrodo-solução (BARD; FAULKNER, 2001).

A voltametria cíclica consiste em realizar a varredura linear de potencial de um eletrodo de trabalho estacionário, utilizando uma forma triangular de potencial, ou seja, inicialmente, o potencial é aplicado com um valor em que nenhuma redução ocorre e, então, utilizando-se da variação de potencial para regiões mais negativas, (regiões catódicas) ocorre a redução da amostra em análise. Em seguida, ocorre a varredura em sentido inverso, até o valor inicial do potencial programado, indo para regiões mais positivas (regiões anódicas), nas quais ocorrerá a oxidação do composto em análise. A forma de excitação pode ser observada na Figura 4 (WANG, 2006; PACHECO et. al., 2013).

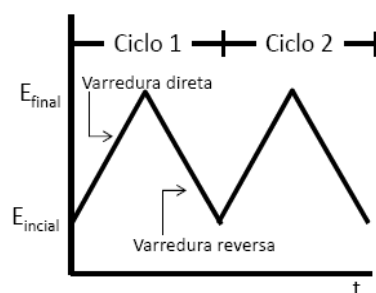


Figura 4 Forma triangular de excitação, varredura de potencial E com tempo t na forma de um ciclo em voltametria cíclica

3.5.2 Voltametria de varredura linear

Nesta modalidade, o potencial aplicado varia linearmente com o tempo. Sua forma de excitação de sinal é constante e linear, tendo apenas a velocidade de varredura como parâmetro do processo eletroquímico. A forma de excitação dessa modalidade pode ser observada na Figura 5 (WANG, 2006; PACHECO et al., 2013).

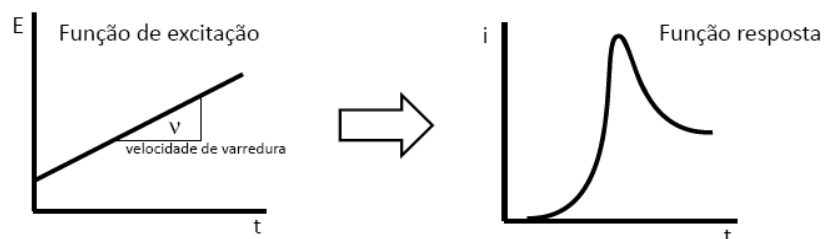


Figura 5 Forma linear da aplicação do potencial E com tempo t e o padrão de resposta obtida em voltametria de varredura linear

3.5.3.1 Voltametria de pulso diferencial

Nesta modalidade voltamétrica, pulso diferencial (DPV), são aplicados pulsos de amplitude fixos, os quais se sobrepõem a uma rampa crescente de potencial aplicado no eletrodo de trabalho (WANG, 2006). Dessa forma, é possível realizar duas medidas da corrente, sendo a primeira antes da aplicação do pulso e a segunda, no final da aplicação do pulso. Por meio do sistema operacional que compõe a instrumentação analítica, a primeira medição é subtraída da segunda, gerando a diferença entre as correntes. Esta, por sua vez, é construída em função do potencial aplicado. A forma de excitação dessa modalidade está evidenciada na Figura 6 (KOUNAVES, 1997; BRETT; BRETT, 1996).

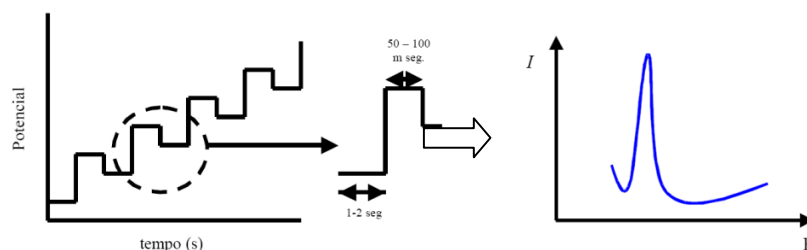


Figura 6 Forma de excitação em pulso de aplicação do potencial E em função do tempo t e o padrão de resposta gaussiano em voltametria de pulso diferencial

O voltamograma tem um perfil característico, representado por uma gaussiana, em que, ao realizar a medição de sua área, é possível relacioná-la diretamente com a concentração do analito. Esta medida é realizada para a correção da corrente capacitiva, devido à forma de aplicação do pulso, que faz com que a corrente capacitiva diminua exponencialmente e a corrente faradáica, linearmente. Dessa forma, é possível realizar a eliminação da contribuição da corrente residual (PACHECO et al., 2013).

A voltametria de pulso diferencial é extremamente utilizada para experimentos de análises de traços em amostras orgânicas e inorgânicas (WANG, 2006).

3.5.3.2 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) foi desenvolvida por Barker e colaboradores, por volta de 1952. Esta técnica de pulso tem muitas semelhanças com a modalidade pulso diferencial, citada anteriormente (BRETT; BRETT, 1996). Nesta modalidade, uma onda quadrada simétrica de amplitude sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada, caracterizada pela amplitude, largura e período, é aplicada ao eletrodo de trabalho (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto e outra ao final do pulso reverso, em que a direção do pulso é contrária à direção da varredura, minimizando a contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida. O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes *versus* a rampa de potencial aplicado (PACHECO et al., 2013). Na Figura 7 estão representados a forma de excitação do sinal e o pico resultante do processo voltamétrico da modalidade onda quadrada.

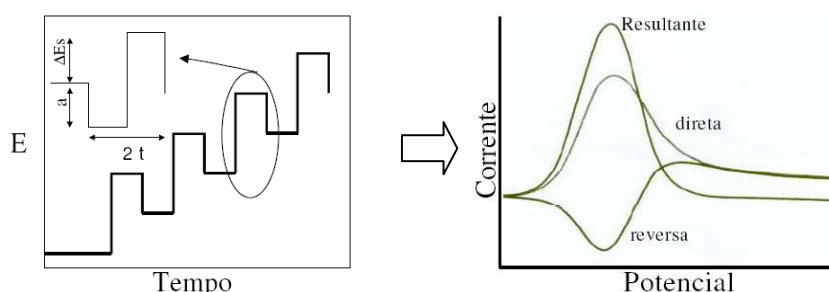


Figura 7 Forma de excitação em pulso de aplicação de potencial E em função do tempo t e o padrão de resposta em voltametria de onda quadrada

3.6 Análise residual de anestésicos utilizando métodos eletroanalíticos

As técnicas usualmente utilizadas para a análise residual de anestésicos em peixes são as cromatográficas (STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 1998; STEHLY; MEINERTZ; GINGERICH, 2000, STEHLY et al., 1995; MEINERTZ et al., 1999; MEINERTZ et al., 2006, KILDEA; ALLAN; KEARNY, 2004; MEINERTZ; SCHREIER, 2009, KIESSLING et al., 2009; SCHERPENISSE; BERGWERFF, 2007). Não foram encontrados, na literatura, trabalhos com o anestésico triclaína utilizando as técnicas eletroquímicas, porém, foram encontrados alguns estudos para a determinação de outros anestésicos, tanto na matriz peixe quanto em outras matrizes.

Melles et al. (2013) estudaram a avaliação química do metabolismo da pele de animais, investigando a presença de eugenol e isoeugenol, utilizando a técnica amperométrica, e compararam com a técnica LC/MS. Foi utilizado eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho e eletrodo de Pd/H₂ como eletrodo de referência. Os autores mostraram que os espectros de massa dos compostos eugenol e isoeugenol são ativos para a oxidação eletroquímica, formando produtos secundários por meio da dimetilação dos anestésicos.

A determinação de benzocaína e butacaína em urina humana foi realizada por Reddy, Balaji e Reddy (2006), por meio da voltametria redissolução anódica na modalidade pulso diferencial. Neste estudo foi utilizado eletrodo de carbono vítreo modificado com nafion (eletrodo de trabalho), Ag/AgCl (eletrodo de referência) e platina (eletrodo auxiliar), e o eletrólito de suporte usado foi solução tampão Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹, em pH de 1 e 2. A amplitude de pulso otimizada foi de 50 mV; a velocidade de varredura, de 10 mV s⁻¹ e o potencial e o tempo de acumulação, de -0,2 V e 210 s, respectivamente. A benzocaína apresentou um potencial de pico em +1,03 V. O método desenvolvido apresentou limites de detecção de 2,40 x 10⁻⁹ mol L⁻¹ e de quantificação de 7,97 x 10⁻⁹ mol L⁻¹, com coeficiente de correlação de 0,9977. A recuperação do método foi de 97%, demonstrando a eficiência da metodologia utilizada.

Arteaga et al. (2012) compararam os resultados da atividade antioxidante dos compostos fenólicos timol, 4-hexilresorcinol, cinamaldeído, sesamol, salilaldeído, carvacrol, ácido gálico, 3-hidroxycumarina e eugenol, por meio da técnica de voltametria cíclica. Como eletrólito de suporte foram utilizadas as soluções de ácido acético e ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹ e as soluções estoque dos compostos fenólicos foram preparadas em etanol, na concentração de 5,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Os eletrodos utilizados foram carbono vítreo (trabalho),

Ag/AgCl (referência) e fio de platina (auxiliar). O potencial de pico anódico para o eugenol foi de 411 mV, em pH 7 e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os autores verificaram que existe boa correlação entre as técnicas, permitindo o uso da voltametria cíclica para a determinação da atividade antioxidante.

Para o mentol, Law (1912) investigou a redução de aldeídos e cetonas em catodo de chumbo. Neste trabalho foi apenas considerada a oxidação de mentol à mentona em solução etanólica em meio ácido sulfúrico e hidróxido de sódio.

Visto a ausência de trabalhos para a determinação de tricaína residual em peixes, a presente pesquisa representa uma contribuição para a investigação do comportamento deste composto utilizando técnicas eletroquímicas, sendo um importante instrumento para a quantificação em filés de pescado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes empregados para as análises foram de grau analítico de pureza (P.A.). Utilizaram-se tricaína (Sigma-Aldrich, P.A.) e, como eletrólitos suportes, KCl (Merck, 99,5%), LiCl (P.A., Vetec), Na₂SO₄ (Sigma-Aldrich, P.A.) e tampão Britton-Robinson (B-R). Todas as soluções, bem como aquelas utilizadas como eletrólito suporte, foram preparadas com água tipo I. A solução padrão de tricaína e as amostras empregadas nos experimentos voltamétricos foram diluídas com o eletrólito de suporte apropriado.

As soluções de eletrólito de suporte foram preparadas em meio aquoso em uma concentração de 0,5 mol L⁻¹ em água tipo I. Todas as soluções foram preparadas à temperatura ambiente e armazenadas em frasco de vidro âmbar, à temperatura de 4 °C.

A solução estoque de tricaína foi preparada em meio aquoso, na concentração de 1,00 x 10⁻¹ mol L⁻¹ em água tipo I, sendo preparada sempre no mesmo dia de utilização. Para a leitura voltamétrica, 1 mL da solução de tricaína foi diluído em 25 mL de solução de KCl 0,5 mol L⁻¹.

4.2 Estudos voltamétricos

4.2.1 Comportamento eletroquímico da tricaína por voltametria cíclica

A tricaína foi estudada utilizando-se a técnica de voltametria cíclica em uma janela de potencial de -1,2 a 2,0 V vs Ag|AgCl (KCl_{sat}). Realizou-se o estudo de varreduras sucessivas, a fim de averiguar o processo que ocorre sobre

a superfície do eletrodo de trabalho. Para isso, foram feitos 10 ciclos ininterruptos, sem o polimento manual da superfície do eletrodo.

Foi realizado o estudo da interferência da velocidade de varredura de potencial no intervalo de 5 a 400 mV s^{-1} , a fim de verificar o processo de transferência de massa que ocorre na superfície do eletrodo.

Realizou-se a variação da velocidade de varredura, com a limpeza manual (polimento metalográfico com alumina), entre cada velocidade de varredura analisada.

4.2.2 Estudo do transporte de massa

Este procedimento foi realizado a fim de averiguar se o processo de transferência de massa entre a solução de tricaína e o eletrodo de trabalho ocorre por difusão ou adsorção. Para isso, o eletrodo de trabalho foi imerso em uma célula eletroquímica de capacidade de 25 mL, por 40 minutos, contendo solução de KCl 0,5 mol L^{-1} e adicionou-se 1 mL de solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida, foi realizada uma leitura eletroquímica na modalidade pulso diferencial.

4.2.3 Otimização dos parâmetros da voltametria de varredura linear

Para otimizar a modalidade voltamétrica varredura linear (LSV), o parâmetro velocidade de varredura (v) foi analisado no intervalo de 5 a 500 mV s^{-1} . A velocidade de varredura considerada otimizada foi aquela que apresentou a maior intensidade de corrente de pico anódico (I_{pa}) e a menor largura de pico à meia altura ($w_{1/2}$).

4.2.4 Otimização dos parâmetros de pulso diferencial

Para otimizar a modalidade voltamétrica de pulso diferencial (DPV), os parâmetros foram tratados de forma univariada. Os parâmetros otimizados foram: velocidade de varredura (v) no intervalo de 2 a 300 mV s^{-1} , amplitude de pulso (A_p) no intervalo de 5 a 300 mV s^{-1} , tempo de pulso (t_p) no intervalo de 2 a 70 ms e incremento de varredura (I_p) no intervalo de 1 a 50V. Foram considerados para cada otimização a relação de I_{pa} e $w_{1/2}$, sendo desejado para o primeiro a maior corrente possível e, para o segundo, a menor largura possível. A otimização foi realizada para ambos os picos de oxidação da tricaína encontrados na voltametria cíclica.

4.2.5 Otimização dos parâmetros de onda quadrada

Os parâmetros otimizados da modalidade voltamétrica de onda quadrada (SWV) foram tratados também de forma univariada. Os parâmetros otimizados foram: amplitude de pulso (A_p) no intervalo de 5 a 150 mV s^{-1} , frequência (f) no intervalo de 5 a 150 Hz e incremento de varredura (I_p) no intervalo de 1 a 20V. Os dados considerados para cada otimização foram quando I_{pa} e $w_{1/2}$ apresentassem a maior corrente e menor largura possível, respectivamente. A otimização foi realizada para ambos os picos de oxidação da tricaína encontrados na voltametria cíclica.

4.2.6 Estudo de pré-concentração

Foi realizado um estudo de pré-concentração para o processo eletroquímico da tricaína. O estudo foi conduzido de forma univariada,

utilizando-se a modalidade pulso diferencial, em que os parâmetros estudados foram o potencial de depósito (E_d) e o tempo de depósito (t_d). O E_d foi variado de +1,8V até -1,2V e o t_d no intervalo de 30 a 240 segundos. Para a otimização, foram considerados favoráveis o E_d e o t_d que apresentassem maior corrente e menor largura possível. A otimização foi realizada para ambos os picos de oxidação da tricaína encontrados na voltametria cíclica.

4.2.7 Curva analítica

A construção da curva analítica foi realizada na ausência da matriz filé de peixe, em eletrólito de suporte KCl 0,5 mol L⁻¹, em concentrações diferentes de tricaína (20 a 90 µmol L⁻¹). Foi utilizada uma regressão linear, por meio de uma equação de reta para a análise da variação de I_{pa} , em função da concentração de tricaína.

4.3 Análise da tricaína em extratos de filé de peixe

4.3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados para as análises foram de alto grau analítico de pureza (P.A.). No presente trabalho, foi utilizada tricaína (Sigma-Aldrich, P.A.) e, como eletrólito de suporte, empregou-se KCl (Merck, 99,5%). As soluções foram preparadas com água tipo I. A solução padrão de tricaína e as amostras empregadas nos experimentos voltamétricos foram diluídas com o eletrólito de suporte apropriado.

As soluções de eletrólito de suporte foram preparadas em meio aquoso em uma concentração de 0,5 mol L⁻¹ em água tipo I, à temperatura ambiente. A solução estoque de tricaína foi preparada em meio aquoso, à concentração de

$1,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ em água tipo I, sendo preparada sempre no mesmo dia de utilização.

Foram utilizadas duas soluções extratoras, a primeira contendo apenas acetonitrila (Sigma-Aldrich, Grau HPLC) e a segunda, uma solução contendo metanol (Sigma-Aldrich, Grau HPLC) e solução tampão McIlvaine (pH 4,4), na proporção de 50:50 v/v. A solução tampão McIlvaine foi preparada com a adição de 1,18 g de ácido cítrico monohidratado (Sigma-Aldrich, P.A.) e 1,16 g de fosfato dissódico dibásico di-idratado (Sigma-Aldrich, P.A.), em 100 mL de água tipo 1.

4.3.2 Obtenção dos extratos

Foram utilizados filés de peixe de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) como matrizes para a amostragem e a quantificação de tricafina, os quais foram fornecidos pelo Laboratório de Metabolismo de Peixes, Departamento de Zootecnia, Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras.

Os filés de peixe foram macerados e testaram-se dois métodos adaptados para a extração da tricafina, sendo o primeiro proposto por Scherpenisse e Bergwerff (2007) e o segundo, por Meinertz et al. (2006; 2009), definidos como método I e método II. Assim, para a escolha do método, foi considerado aquele que apresentasse maior sensibilidade na adição de padrão de tricafina na matriz.

O método I consistiu na utilização de 5 g do filé macerado, colocado em um recipiente de vidro e adicionou-se sobre o filé 1 mL de solução de tricafina ($1,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), deixando em repouso por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se ao filé 5 mL de solução extratora (contendo 50:50 v/v metanol:tampão McIlvaine pH 4,4) e com o auxílio de um agitador mecânico (Quimis - 2501) equipado com pás (4 cm diâmetro). Este extrato foi agitado por

5 minutos e, depois, centrifugado, a 3.400 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado em frasco de vidro âmbar e reservado para a análise, a 4 °C. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para assegurar que toda a solução de tricaína fosse extraída do filé do peixe.

O método II foi realizado utilizando-se 5 g de filé macerado, acondicionado em tubos com volume de 50 mL de fundo cônico com tampa rosqueada. Adicionou-se ao filé 1 mL de solução de tricaína ($1,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$), deixando-se em repouso por 10 minutos. Para a extração, adicionaram-se aos filés 5 mL de acetonitrila. Este extrato foi agitado em um Vortex Mixer (Vixar[®]), por 5 minutos e centrifugou-se, a 3.400 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado em frasco de vidro âmbar e reservado, a 4 °C, para a análise. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, para assegurar que toda a solução de tricaína fosse extraída do filé do peixe.

4.3.3 Análise de interferentes na matriz

Foi estudado o efeito da matriz no extrato do filé de peixe pelos métodos de extração I e II, com ausência do anestésico tricaína. Em uma célula eletroquímica foram adicionados 25 mL de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mL do extrato obtido pelo método I, e realizou-se a medida voltamétrica, utilizando-se a modalidade pulso diferencial. O mesmo procedimento foi realizado para o extrato obtido pelo método II.

Foi realizado também o estudo da sensibilidade e da seletividade dos métodos de extração I e II na matriz peixe. Foram adicionados 25 mL de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mL do extrato obtido pelo método I na célula eletroquímica, e construiu-se uma curva analítica com a adição de diferentes concentrações de tricaína (8×10^{-5} ; 9×10^{-5} ; 1×10^{-4} ; 3×10^{-4} ; 5×10^{-4} ; 7×10^{-4} e $9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). O

mesmo procedimento foi realizado para o extrato obtido pelo método II e as medidas voltamétricas foram obtidas pela modalidade pulso diferencial.

4.2.4 Quantificação da tricaína utilizando voltametria de pulso diferencial

Para a quantificação da tricaína utilizando voltametria de pulso diferencial foram utilizados os seguintes parâmetros: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$ e $I_p = 20 \text{ V}$, em uma janela de potencial de $-1,2$ a $2,0 \text{ V vs Ag|AgCl (KCl}_{\text{sat}})$.

4.2.5 Ensaios de recuperação

Para os ensaios de recuperação foi realizada a fortificação de 5 g de filé de peixe com a adição de 200, 300 e 500 μL de tricaína ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), a qual foi submetida à extração pelos métodos I e II. Para garantir a eficiência do método foi necessário que a recuperação apresentasse boa relação entre a concentração padrão e a concentração fortificada. Estudos estatísticos determinam que a recuperação é eficiente quando o intervalo obtido está entre 70% a 120%, conforme a Equação 1 (HARRIS, 2008).

$$\% \text{Recuperação} = \frac{\text{concentração medida}}{\text{concentração esperada}} \times 100$$

(Equação 1)

4.3 Instrumentação eletroquímica

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se um bipotenciostato/galvanostato μ Stat 400 (Metrohm Pensalab) interfaceado pelo software DropSens versão 4.6. Foi utilizada uma célula eletroquímica de 100 mL com arranjo de três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, carbono vítreo com área geométrica de 0,034 cm², um eletrodo auxiliar de fio de platina e um eletrodo de referência Ag|AgCl (KCl_{sat}). Foi realizado polimento da superfície do eletrodo antes de cada medida eletroquímica, por cerca de 3 minutos, em feltro metalográfico, contendo suspensão de alumina com granulometria de 0,3 μ m. Antes de cada análise, foi realizada a remoção do oxigênio eletroativo, dissolvido no eletrólito de suporte, utilizando-se a passagem de gás nitrogênio por 5 minutos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo do eletrólito de suporte

A função do eletrólito de suporte é evitar que ocorra o processo de migração, ou seja, a formação de um campo elétrico entre a solução e o eletrodo de trabalho. Para isso, durante a análise voltamétrica, utiliza-se uma solução iônica pelo menos cem vezes mais concentrada que a solução em estudo.

Como eletrólito de suporte foram realizados estudos com os reagentes sulfato de sódio, cloreto de lítio, solução tampão Britton-Robinson (pH = 7) e cloreto de potássio. As respostas voltamétricas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 Resposta voltamétrica da tricaína em diferentes eletrólitos de suporte

Eletrólito de suporte	Resposta voltamétrica
Sulfato de sódio	Resposta na oxidação Sem resposta na DPV
Cloreto de lítio	Resposta na oxidação Baixa resposta na DPV
Cloreto de potássio	Resposta na oxidação
Tampão Britton-Robinson	Resposta na oxidação

O eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson e o cloreto de potássio apresentaram boa resposta na oxidação dos picos da tricaína, em ambas as modalidades, CV e DPV. Contudo, a escolha do eletrólito de suporte foi em referência aos custos comerciais e à possibilidade de ampliação da janela voltamétrica para a análise de tricaína. Assim, no presente trabalho, foi utilizado o cloreto de potássio como eletrólito de suporte, na concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

5.2 Comportamento eletroquímico da tricaína

Foi estudado o comportamento eletroquímico da tricaína utilizando-se a modalidade CV sobre o eletrodo de carbono vítreo (GCE). O composto foi analisado no intervalo de -1,2 a 2,0 V *vs* Ag|AgCl (KCl_{sat}), em solução de eletrólito de suporte KCl 0,5 mol L⁻¹.

Foi utilizado o eletrodo de carbono vítreo (eletrodo de trabalho), por ser de baixo custo comercial, e possível recuperação da superfície. Este eletrodo foi empregado em todas as análises voltamétricas do presente trabalho.

Na Figura 8 é possível observar dois picos anódicos, com potenciais de 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II), na *v* de 60 mV s⁻¹. Por meio do voltamograma foi possível visualizar que ocorrem dois processos de oxidação, não sendo observado nenhum pico na varredura catódica.

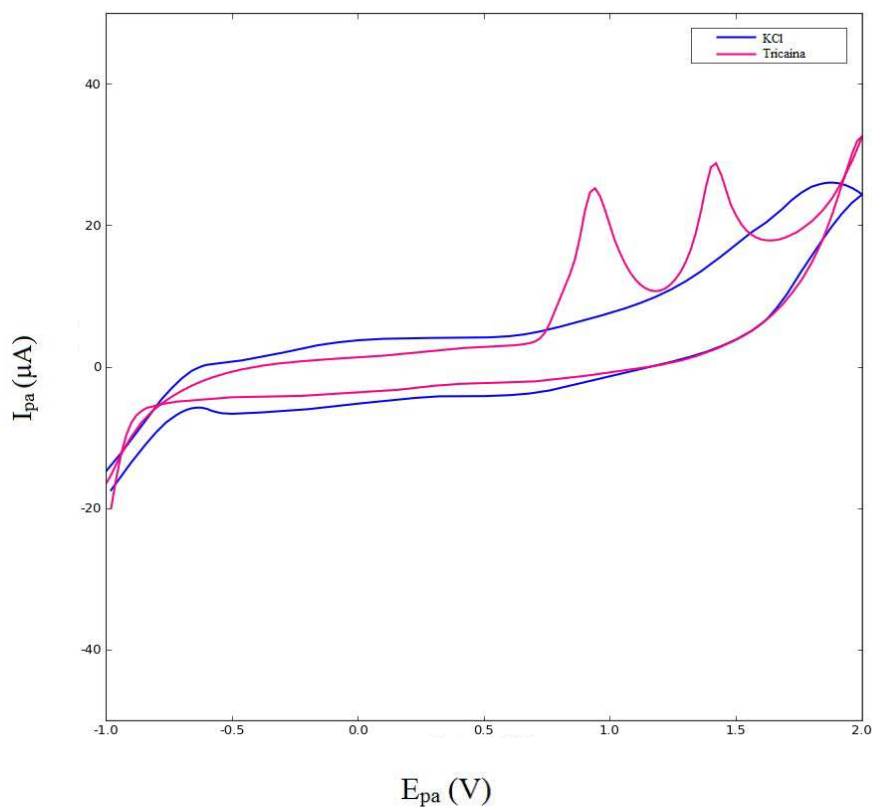


Figura 8 Voltamogramas cíclicos de solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$

Foi estudada a influência de varreduras sucessivas de potencial durante 10 ciclos ininterruptos, sem a limpeza mecânica do eletrodo de trabalho, a v de 100 mV s^{-1} .

Na Figura 9 observa-se uma diminuição da intensidade da corrente de ambos os picos a partir do segundo até o décimo ciclo de varredura. Observa-se uma queda de 100% de corrente entre a primeira e a segunda leitura, para o pico I e 96% para o pico II.

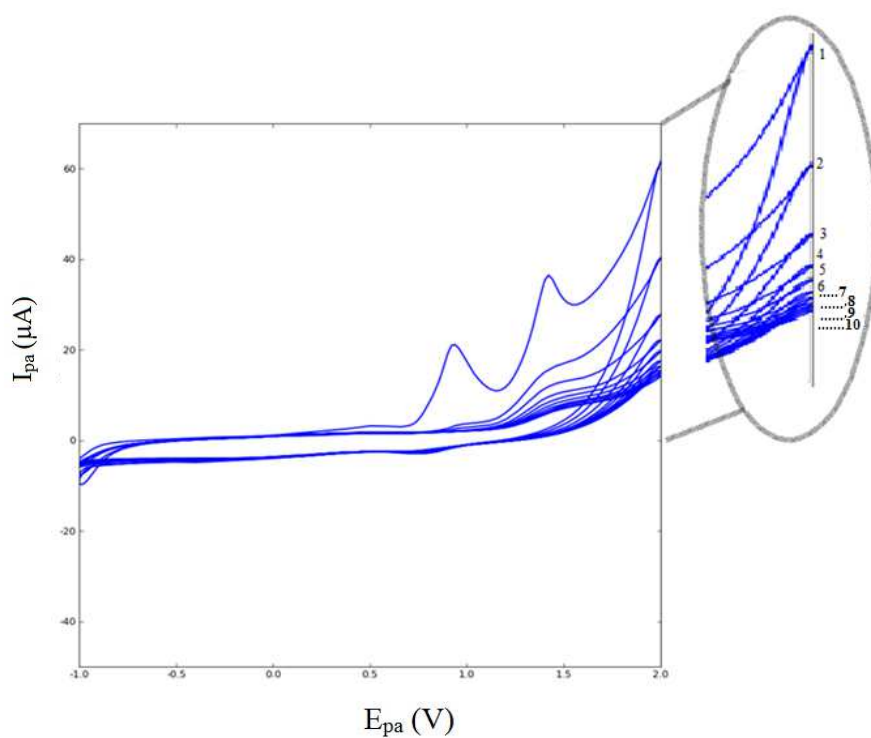


Figura 9 Voltamogramas cíclicos da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, durante a varredura sucessiva de potencial, durante dez ciclos, $v = 60 \text{ mV s}^{-1}$

Com este estudo foi possível salientar a necessidade da limpeza mecânica antes de cada leitura voltamétrica, para garantir 100% de I_{pa} . Além disso, esta queda de corrente entre os ciclos demonstra que o processo de transporte de massa é por meio da difusão e não adsorção que, ao contrário, haveria um aumento crescente da corrente de pico, devido às espécies iônicas adsorvidas.

5.2.1 Influência da velocidade de varredura de potencial usando voltametria cíclica

Com este estudo foi possível obter informações em relação ao analito, como seu mecanismo de transporte de massa, mecanismo do processo redox e reversibilidade do sistema. Na Figura 10 apresentam-se os voltamogramas obtidos para a análise da tricaína em KCl 0,5 mol L⁻¹, em diferentes velocidades de varreduras para ambos os picos.

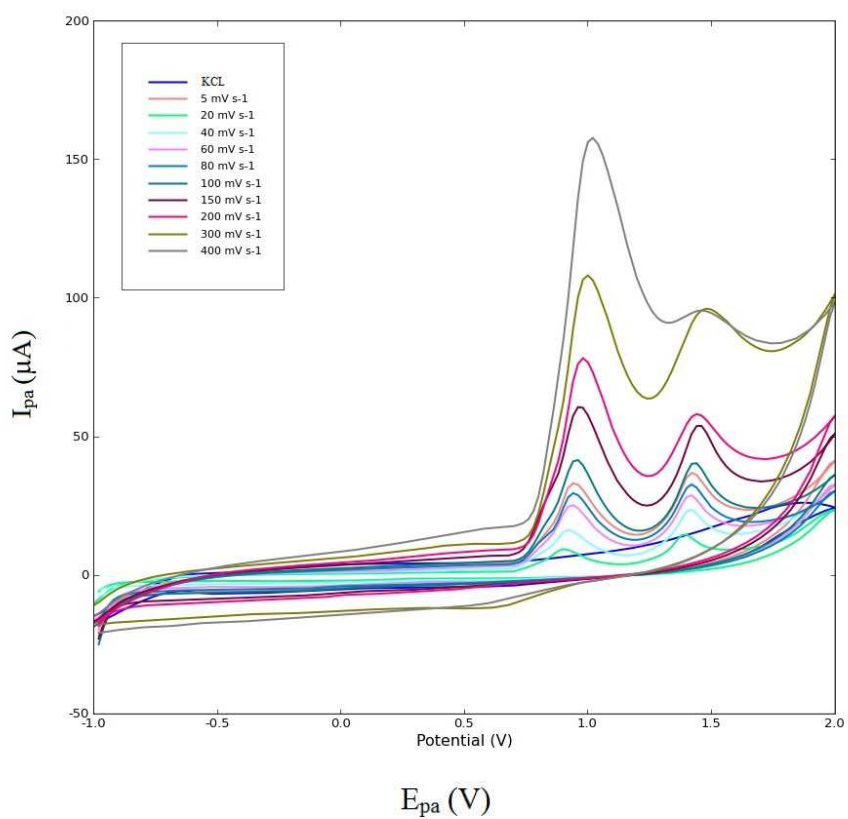


Figura 10 Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes v (5 a 400 mV s^{-1}), utilizando voltametria cíclica

Foi possível observar o aumento da I_{pa} e $w_{1/2}$ em função da v para o pico I. Já para o pico II, o comportamento em função da v foi variável. Nos Gráficos 1 e 2 observa-se a variação da I_{pa} e $w_{1/2}$ em função da v do pico I e do pico II.

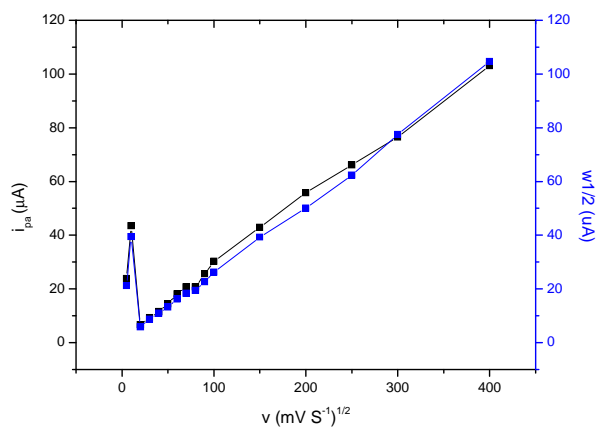


Gráfico 1 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v (5 a 400 mV s^{-1}) para o pico I, usando a voltametria cíclica

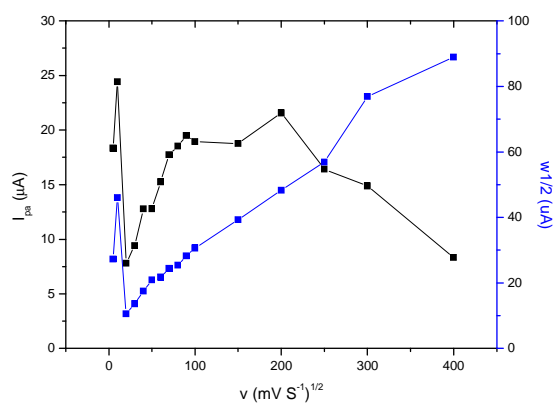


Gráfico 2 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v (5 a 400 mV s^{-1}) para o pico II, usando a voltametria cíclica

Durante todo o processo de avaliação dos parâmetros, o pico I demonstrou maior estabilidade de corrente que o pico II, o que pode ser atribuído à estrutura química da tricaína (Figura 2c), em que o grupamento metanossulfonado não se encontra ligado diretamente à molécula, estando apenas solvatado. Assim, é possível prever que, ao aplicar o potencial externo, este grupamento sofre uma oxidação (pico II) e se desliga temporariamente da molécula. Extinguindo-se o potencial aplicado, este volta a solvatar a molécula da tricaína.

Os melhores resultados obtidos para ambos os picos foi na v de 60 mV s^{-1} , por apresentar melhor relação entre a I_{pa} e $w_{1/2}$ em função da v . Nos Gráficos 3 e 4 estão demonstradas as relações entre I_{pa} e a $v^{1/2}$ do pico I e do pico II.

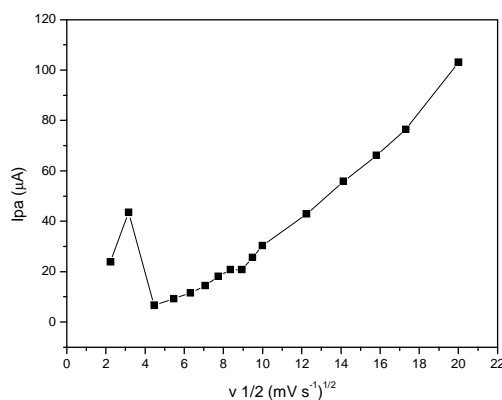


Gráfico 3 Variação de I_{pa} de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da $v^{1/2}$ para o pico I, usando voltametria cíclica

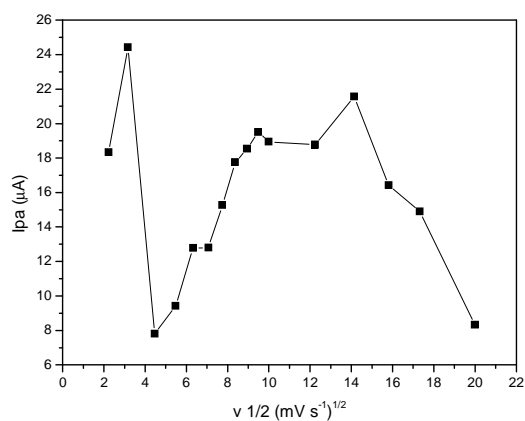


Gráfico 4 Variação de I_{pa} de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da $v^{1/2}$ para o pico II, usando voltametria cíclica

Para o pico I foi possível observar que, apesar de haver uma pequena variação nas primeiras v , I_{pa} tendeu a uma relação linear com a $v^{1/2}$. Para o pico II não foi possível definir esta relação, visto que este se apresentou completamente instável.

Considerando que o pico I é o principal do processo voltamétrico, foi possível descrever que o processo de transporte de massa que ocorre entre a solução e a superfície do eletrodo é o controle por difusão (BARD; FAULKNER, 2001).

Outro estudo importante foi a relação $(I_{pa}/v^{1/2})$ em função da v . Nos Gráficos 5 e 6 demonstra-se o comportamento da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

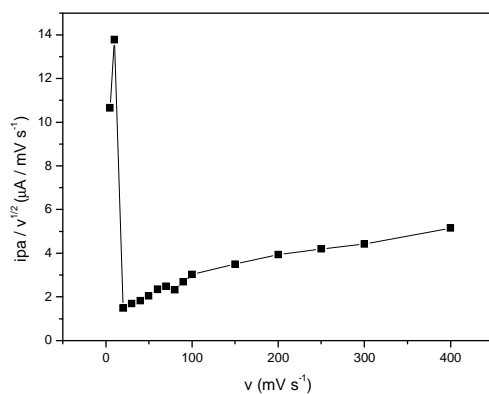


Gráfico 5 Variação de $I_{pa}/v^{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v para o pico I

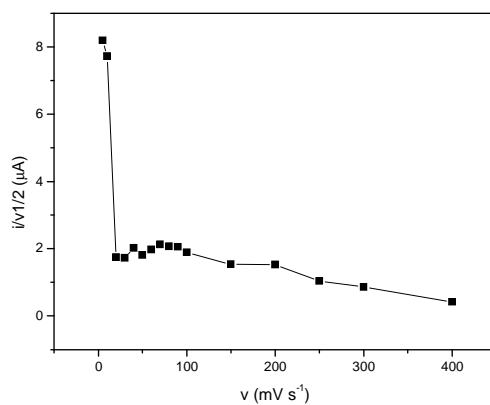


Gráfico 6 Variação de $I_{pa}/v^{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de diferentes v para o pico II

Desconsiderando as primeiras velocidades de varredura, ambos os picos apresentam uma relação que tende à linearidade. Segundo Nicholson e Shain (1964), para relações lineares de $I_p/v^{1/2}$ em função v foi possível salientar que o processo ocorre de forma irreversível. Esta informação valida que o comportamento voltamétrico da tricaína ocorre exclusivamente por oxidação,

com a presença de dois picos anódicos. Ainda foi possível afirmar que o processo eletroquímico irreversível ocorre por reações químicas sem complicações cinéticas, controlado por um processo difusional.

5.2.2 Processo de transporte de massa da tricaína

Adicionalmente, foi realizado um estudo específico para definir o processo de transporte de massa que ocorre com a tricaína, durante o experimento voltamétrico. Este estudo foi realizado devido à instabilidade do pico II, visto que todas as outras informações apresentadas até o momento sugerem que o processo de transporte de massa ocorre de forma difusional.

A leitura eletroquímica foi realizada após 40 minutos de imersão do eletrodo de carbono vítreo em uma solução de tricaína, na concentração de $3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Não foi observado pico na varredura anódica, confirmando que o processo de transporte de massa ocorre inteiramente de forma difusional. Se o transporte fosse por adsorção, os resultados verificados seriam completamente inversos, apresentando picos com intensidade crescente de corrente em função do tempo de imersão do eletrodo de trabalho na solução de tricaína. Na Figura 11 observam-se os voltamogramas obtidos da solução de tricaína com este estudo para o pico I e para o pico II. Na Tabela 2 encontra-se um resumo dos principais parâmetros voltamétricos analisados utilizando CV.

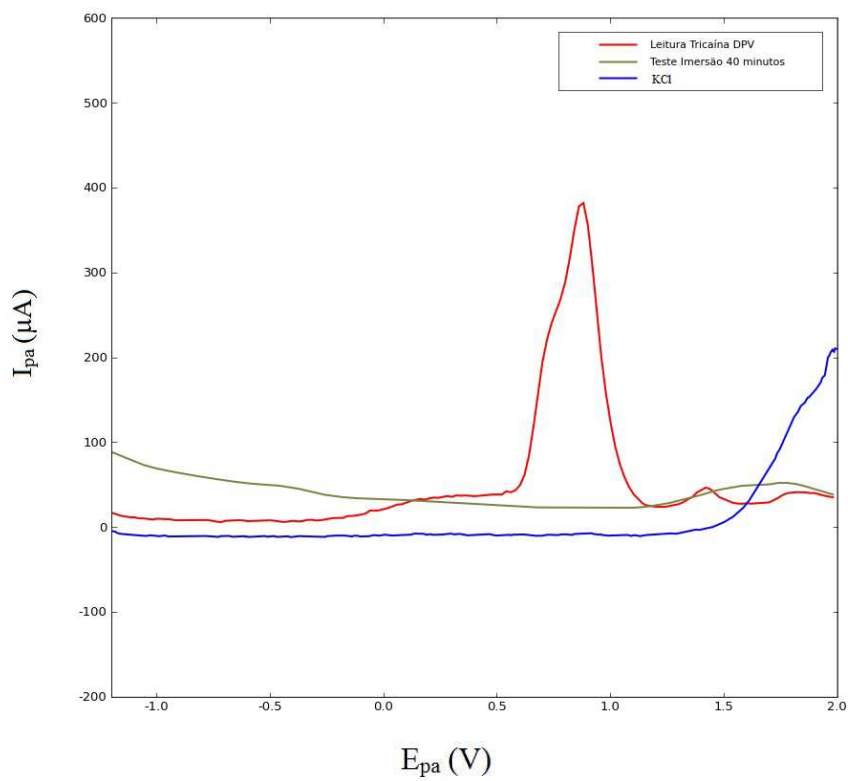


Figura 11 Voltamogramas na modalidade DPV para a leitura de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sem o tempo de imersão e com 40 minutos de imersão

Tabela 2 Principais parâmetros voltamétricos da oxidação dos picos I e II na modalidade cíclica

Pico	ν	E_p	I_p	$ E_p - E_{p/2} $	$I_p / \nu^{1/2}$
	mV s^{-1}	V	μA	mV	$\mu\text{A} / \text{mV s}^{-1} / \text{s}^{1/2}$
I	5	0,84	23,82	0,05	10,65
	10	0,86	43,55	0,07	13,77
	20	0,80	6,638	0,07	1,484
	30	0,82	9,257	0,06	1,690
	40	0,82	11,52	0,06	1,821
	50	0,84	14,43	0,07	2,041
	60	0,84	18,15	0,07	2,343
	70	0,84	20,72	0,07	2,477
	80	0,84	20,72	0,06	2,317
	90	0,84	25,55	0,06	2,693
	100	0,86	30,27	0,08	3,027
	150	0,88	42,86	0,08	3,500
	200	0,88	55,75	0,08	3,942
	250	0,89	66,19	0,08	4,186
	300	1,00	76,44	0,08	4,413
	400	1,02	103,04	0,09	5,152
II	5	1,32	18,33	0,05	8,198
	10	1,34	24,42	0,06	7,724
	20	1,30	7,809	0,05	1,746
	30	1,30	9,429	0,05	1,721
	40	1,32	12,78	0,06	2,021
	50	1,32	12,79	0,06	1,809
	60	1,32	15,26	0,06	1,970
	70	1,32	17,75	0,06	2,121
	80	1,32	18,53	0,05	2,072
	90	1,32	19,50	0,05	2,056
	100	1,33	18,94	0,06	1,894
	150	1,34	18,77	0,07	1,532
	200	1,35	21,56	0,07	1,524
	250	1,36	16,41	0,08	1,038
	300	1,36	14,89	0,09	0,859
	400	1,36	8,32	0,09	0,416

É possível observar, na Tabela 2, que, nas velocidades de varredura de 300 e 400 mV s^{-1} , ocorreu um deslocamento dos potenciais de oxidação para valores mais positivos do pico I. Já para o pico II, não ocorre mudança nestes potenciais. Ainda foi possível observar, para o pico I, uma variação na relação $I_p/v^{1/2}$, durante as primeiras velocidades de varredura, estabilizando-se posteriormente com o aumento proporcional a v . Já para o pico II, não ocorre a estabilização desta relação, mantendo-se variável durante todo o intervalo analisado. Ainda é possível salientar uma variação de $\pm 0,02$ V, que ocorre em $E_p - E_{p/2}$, demonstrando um deslocamento de potenciais à meia altura, ou seja, o aumento de $w_{1/2}$ afeta o potencial de oxidação do pico I e pico II, deslocando-o para potenciais mais positivos ou mais negativos. Na v de 60 mV s^{-1} ocorre uma estabilização dos potenciais de oxidação, além de apresentar boa relação de $w_{1/2}$, permitindo que a tricaína seja analisada em concentrações mais baixas, sem deslocamento do potencial ou perda efetiva de I_{pa} . Apesar de v maior que 60 mV s^{-1} apresentar valores maiores de I_{pa} , em consequência, apresenta valores maiores de $w_{1/2}$.

Esta análise permitiu confirmar a instabilidade do pico II durante o processo eletródico e, conforme já mencionado anteriormente, isso se deve à forma estrutural da molécula e ao tipo de ligação do grupamento metanossulfonado. Ainda, ao analisar os dados, foi possível salientar o processo de transporte de massa, a irreversibilidade do sistema e os mecanismos de reação proposto, já descritos anteriormente.

5.3 Mecanismo de oxidação da tricaína

Foi proposto um mecanismo de reação para o processo de oxidação irreversível da tricaína. Inicialmente, foi possível averiguar que o grupamento metanossulfonado libera um próton ao aplicar o potencial externo, e este

interage com o grupamento amina protonando-o, gerando um pico de oxidação em 1,3 V (pico II). Simultaneamente, ocorre a interação dos íons cloreto presentes na dissociação do cloreto de potássio. Depois, ocorre a desprotonação deste grupamento amina com a liberação de um próton, gerando um pico de oxidação em 0,8 V (pico I). Na Figura 12 mostra-se a proposta do mecanismo de oxidação da tricaína (REDDY; BALAJI; REDDY, 2006; LUND; HAMMERICH, 2001).

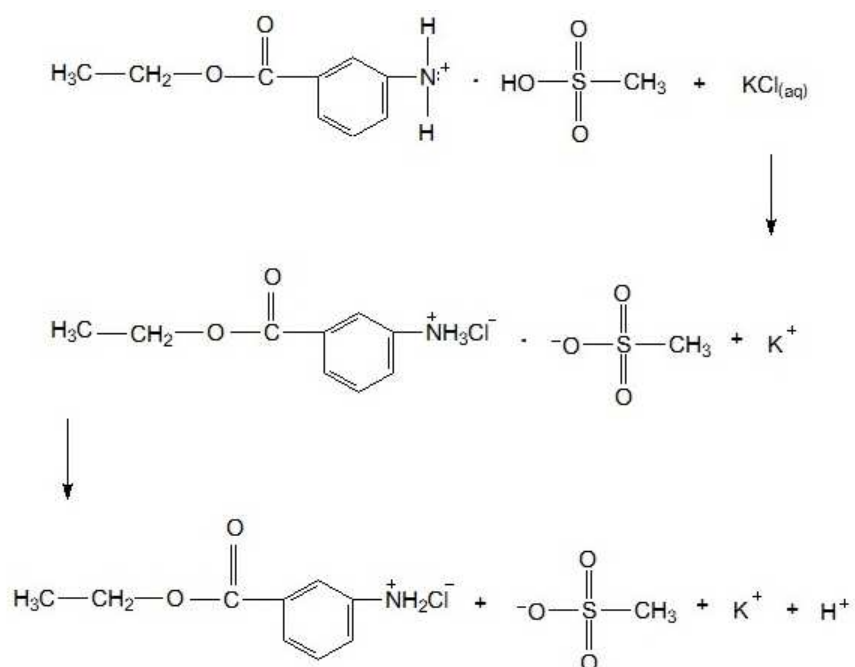


Figura 12 Mecanismo de oxidação de uma solução de tricaína $3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, segundo os resultados experimentais usando voltametria cíclica

5.4 Voltametria de varredura linear

5.4.1 Influência da velocidade de varredura de potencial da tricaína

Na Figura 13 mostram-se os voltamogramas obtidos para a análise da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) durante a variação de v na modalidade LSV.

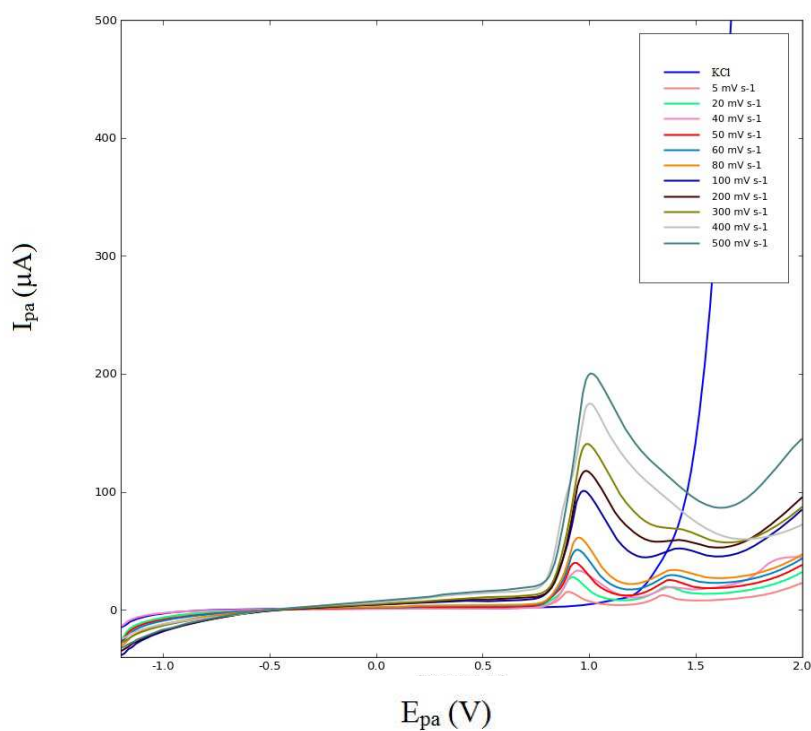


Figura 13 Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes v (5 a 500 mV s^{-1}), utilizando a modalidade LSV

Para melhor compreensão dos resultados, foi construído um gráfico da intensidade de I_{pa} e $w_{1/2}$, em função de v para os picos I e II, conforme os Gráficos 7 e 8.

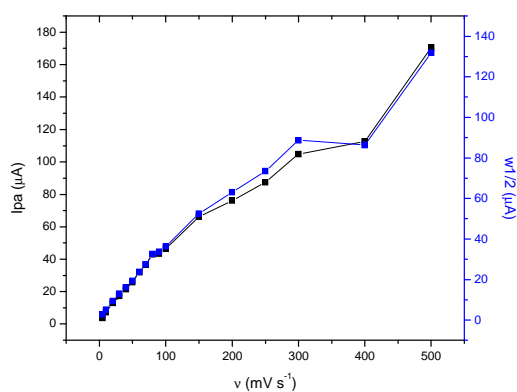


Gráfico 7 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da v (5 a 500 mV s^{-1}), utilizando LSV, para o pico I

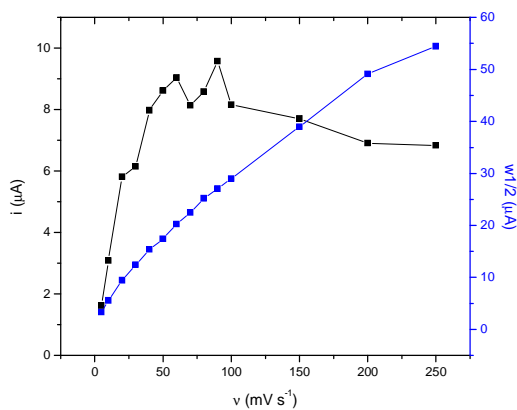


Gráfico 8 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da v (5 a 500 mV s^{-1}), utilizando LSV, para o pico II

Para o pico I foi possível observar que I_{pa} e $w_{1/2}$ aumentam proporcionalmente com v , chegando a uma intensidade de corrente máxima de $170 \mu A$. Para o pico II, o comportamento foi diferente: enquanto $w_{1/2}$ aumenta proporcionalmente com v , a I_{pa} foi até 90 mV s^{-1} e, a partir de 100 mV s^{-1} , decaiu. Ao atingir as velocidades mais altas (300 a 500 mV s^{-1}), não foi possível registrar a presença do pico, sendo o último sinal obtido em 250 mV s^{-1} . Também se observou um pequeno deslocamento de potencial em função do aumento da velocidade de varredura. A maior intensidade de corrente de pico obtida foi de $9 \mu A$ e é importante ressaltar que esta corrente é, aproximadamente, 19 vezes menor que a corrente obtida para o pico I.

Dessa forma, utilizou-se, como critério para a escolha da melhor velocidade de varredura, aquela que apresentasse a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$, ou seja, maior altura e menor largura. Assim, a velocidade de 50 mV s^{-1} apresentou os melhores resultados, com I_{pa} de $26 \mu A$ e $w_{1/2}$ de $19 \mu A$, para o pico I e I_{pa} de $8 \mu A$ e $w_{1/2}$ de $17 \mu A$, para o pico II.

5.5 Voltametria de pulso diferencial

5.5.1 Influência da velocidade de varredura

Nesta modalidade voltamétrica foram otimizados a velocidade de varredura (v), a amplitude de pulso (A_p), o tempo de pulso (t_p) e o incremento de varredura (I_p) de forma univariada. Para este estudo, manteve-se constante A_p igual a 75 mV s^{-1} , t_p igual a 10 ms e I_p igual a 5 mV , A_p e variou-se v . Na Figura 14 evidenciam-se os voltamogramas obtidos da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

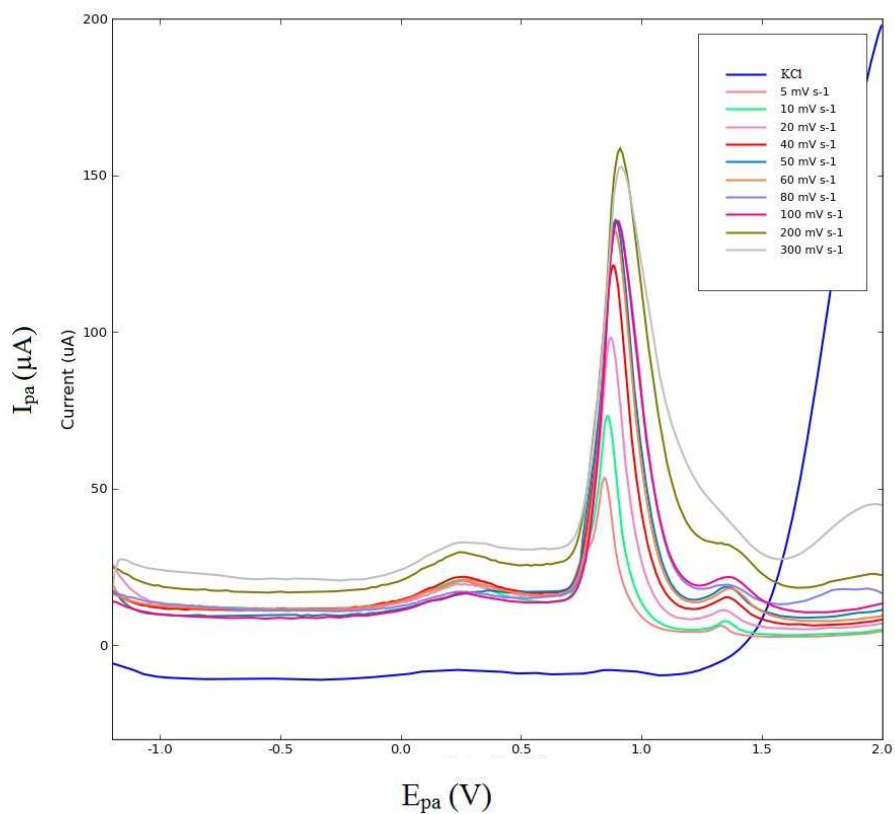


Figura 14 Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes v (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando voltametria pulso diferencial, $A_p = 75 \text{ mV s}^{-1}$, t_p ms e $I_p = 5 \text{ mV}$

A partir dos voltamogramas da Figura 14 foi possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação de $0,8 \text{ V}$ (pico I) e $1,3 \text{ V}$ (pico II) *vs.* Ag|AgCl (KCl_{sat}).

Analisando-se os resultados por meio da comparação de I_{pa} e $w_{1/2}$ em função de v foi possível construir um gráfico para ambos os picos, como mostrado nos Gráficos 9 e 10.

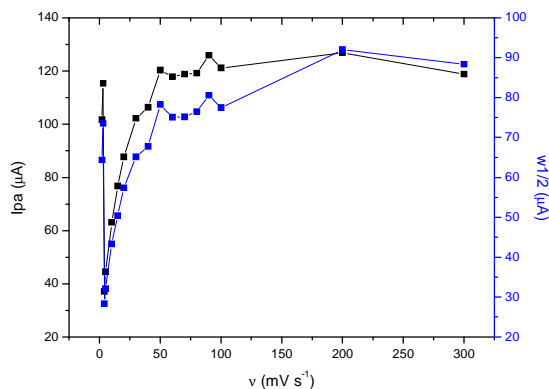


Gráfico 9 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em função da v (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando DPV, para o pico I

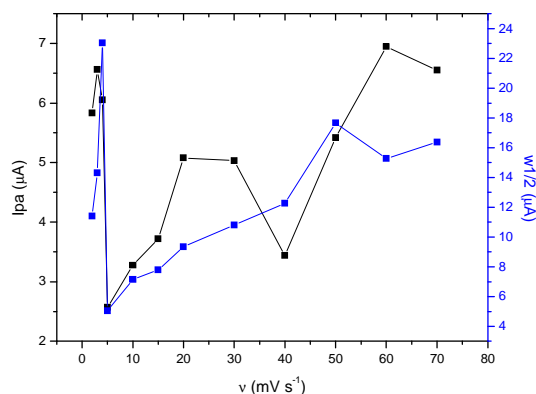


Gráfico 10 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em função da v (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando DPV, para o pico II

Para o pico I foi possível observar que I_{pa} e $w_{1/2}$ aumentam proporcionalmente a v , porém, ocorrem variações de I_{pa} durante o estudo das velocidades de varredura mais lentas e mais rápidas. A variação de I_{pa} máxima foi de $126 \mu\text{A}$ e $w_{1/2}$ foi de $92 \mu\text{A}$ na v de 200 mV s^{-1} .

Para o pico II, o comportamento apresentado foi diferente do pico I. Enquanto $w_{1/2}$ aumentou proporcionalmente com v , ao contrário, em I_{pa}

ocorreram variações que podem ser observadas no início com as primeiras v , entre 30 e 50 mV s^{-1} , e, ainda, nas v finais, ou seja, I_{pa} não sofreu influência proporcional ao aumento de v . A variação de I_{pa} máxima foi de 6,7 μA e $w_{1/2}$ foi de 15,3 μA na v de 60 mV s^{-1} .

Ainda, para ambos os picos foi possível observar um pequeno deslocamento de potencial (E_p) em função do aumento de v .

Sendo assim, foram utilizados os valores de I_{pa} e $w_{1/2}$ como critério para a escolha da velocidade de varredura. Foi possível verificar que v em 50 mV s^{-1} apresentou os melhores resultados, com I_{pa} igual a 120 μA e $w_{1/2}$ igual a 78 μA , para o pico I. Já para o pico II, I_{pa} foi 5 μA e $w_{1/2}$ foi 17 μA . É importante destacar que o pico I apresentou I_{pa} 24 vezes maior que o pico II.

5.5.2 Influência da amplitude de pulso

Para este estudo, manteve-se constante v igual a 50 mV s^{-1} , t_p igual a 10ms e I_p igual a 5mV e variou-se A_p . Na Figura 15 mostram-se os voltamogramas obtidos.

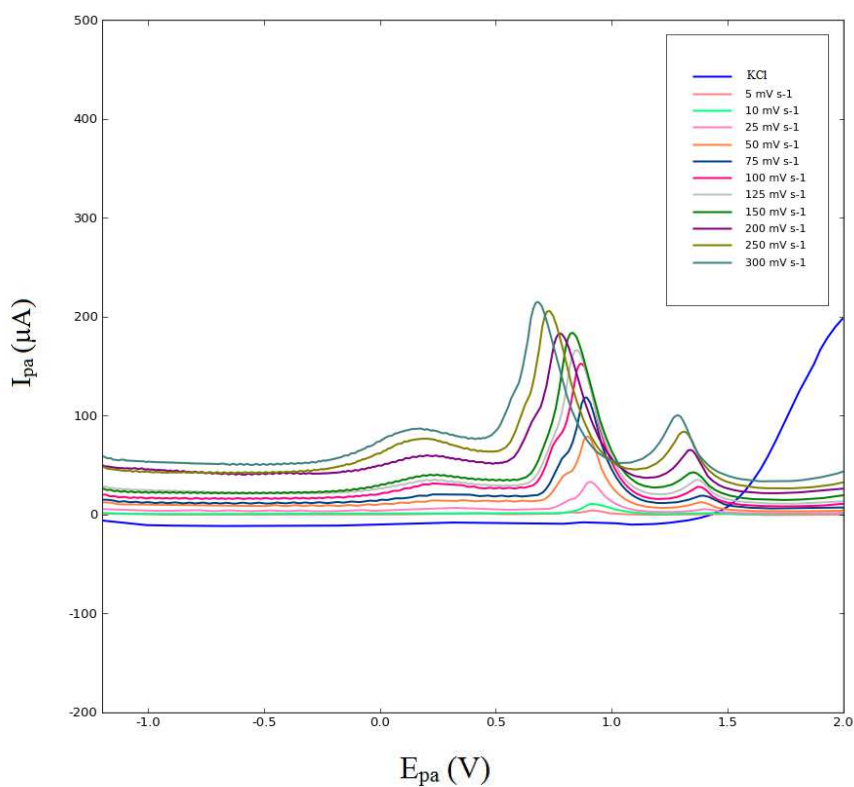


Figura 15 Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes A_p (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando voltametria de pulso diferencial, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 10 \text{ ms}$ e $I_p = 5 \text{ mV}$

Na Figura 15 foi possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação de $0,8 \text{ V}$ (pico I) e $1,3 \text{ V}$ (pico II) vs. Ag|AgCl (KCl_{sat}). Nos Gráficos 11 e 12 mostram-se I_{pa} e $w_{1/2}$ função da variação de A_p .

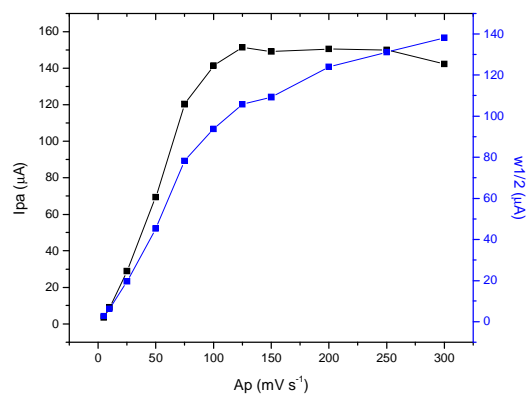


Gráfico 11 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da variação de A_p (5 a 300 mV s^{-1}), utilizando DPV, para o pico I.

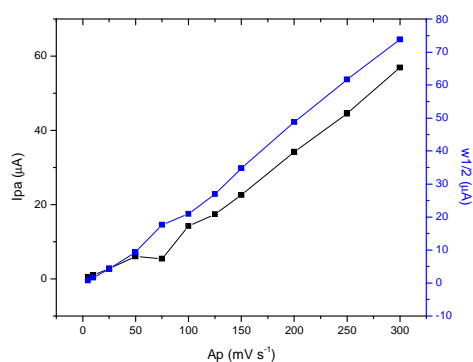


Gráfico 12 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função da variação de A_p (5 a 300 mV s^{-1}) utilizando DPV, para o pico II

Para ambos os picos foi possível observar que I_{pa} e $w_{1/2}$ aumentaram proporcionalmente com A_p . Para pico I ocorreu, em A_p igual a 300 mV s^{-1} , uma pequena diminuição de I_{pa} , porém, $w_{1/2}$ continuou a aumentar

proporcionalmente. Já para o pico II esta pequena variação ocorreu nos valores menores de A_p .

A variação de I_{pa} máxima foi de $151 \mu A$ e $w_{1/2}$ igual a $105 \mu A$, na amplitude de pulso de 125 mV s^{-1} , para o pico I. Já para o pico II, os valores obtidos foram de $56 \mu A$ e $73 \mu A$, respectivamente, na amplitude de pulso de 300 mV s^{-1} .

Ainda é importante salientar que ocorre um deslocamento E_p , tanto para A_p máxima como mínima. Este deslocamento, para ambos os picos, foi de $\pm 0,1V$ vs $Ag|AgCl (KCl_{sat})$.

Dessa forma, foi utilizada, como critério de otimização de A_p , a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$, e, ainda, observou-se A_p com menor variação de E_p , mantendo-se em $0,8 V$, para o pico I e $1,3 V$, para o pico II. Assim, o comportamento voltamétrico da tricaína frente à variação de A_p apresentou os melhores resultados em 125 mV s^{-1} , com I_{pa} de $151 \mu A$ e $w_{1/2}$ de $105 \mu A$, para o pico I. Já para o pico II, I_{pa} foi igual a $17 \mu A$ e $w_{1/2}$ de $27 \mu A$.

5.5.3 Influência do tempo de pulso

Para este estudo, mantiveram-se constantes I_p a 5 mV e os parâmetros otimizados, v a 50 mV s^{-1} e A_p a 125 mV s^{-1} , variando apenas t_p . Os voltamogramas obtidos para este estudo podem ser observados na Figura 16.

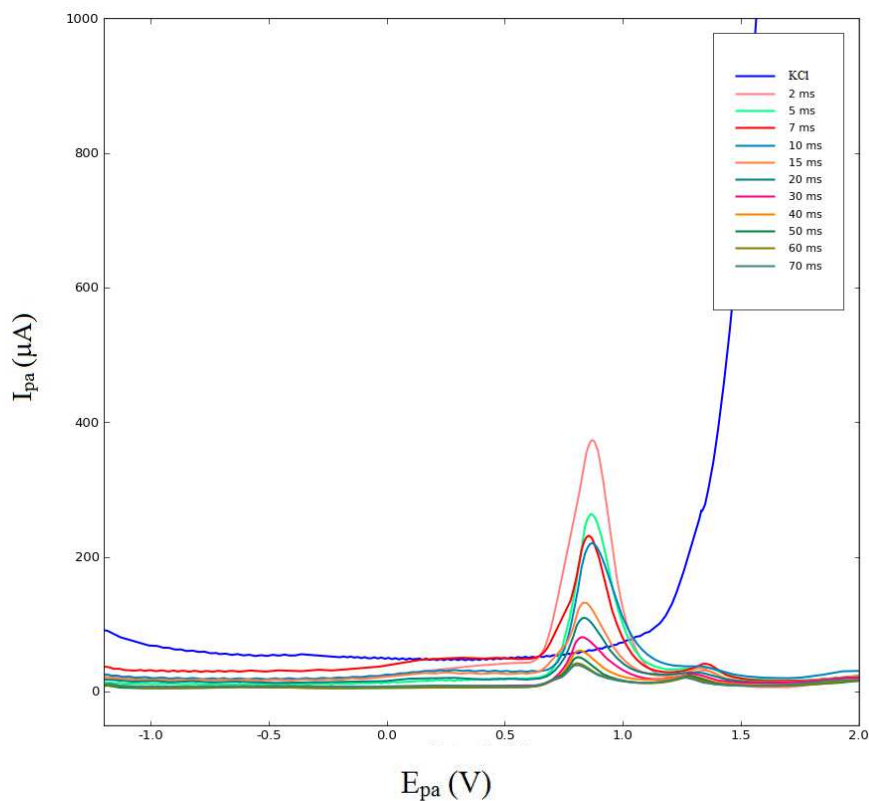


Figura 16 Voltamogramas da solução de uricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes t_p (2 a 70 ms), utilizando voltametria de pulso diferencial, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $I_p = 5 \text{ mV}$

Foi possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação de 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II) *vs.* $\text{Ag|AgCl (KCl}_{\text{sat}})$. Nos Gráficos 13 e 14 mostram-se I_{pa} e $w_{1/2}$, em função da variação de t_p .

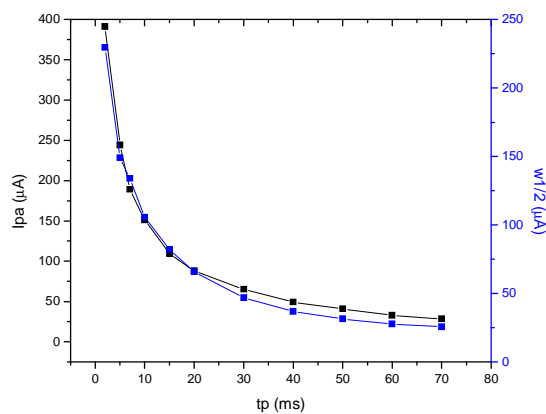


Gráfico 13 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_p (2 a 70 ms), utilizando DPV, para o pico I.

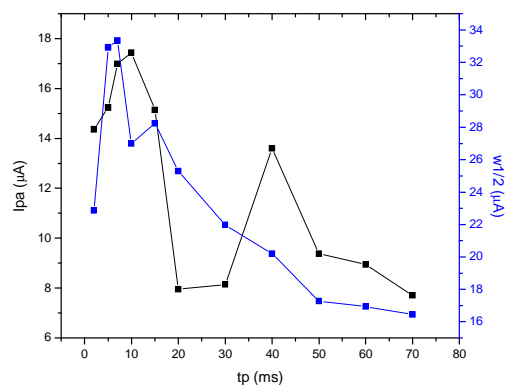


Gráfico 14 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_p (2 a 70 ms) utilizando DPV, para o pico II

Para o pico I, é possível observar, no Gráfico 15, que I_{pa} e $w_{1/2}$ diminuem proporcionalmente com o aumento de t_p . Para o pico II é possível observar que

ocorrem variações durante todo o tempo de pulso estudado, porém, segue o mesmo comportamento do pico I.

Para o pico I, a variação de I_{pa} máxima foi de 391 μA e $w_{1/2}$ foi de 230 μA em t_p igual a 2 ms. Para o pico II, os valores obtidos foram de 17 μA e 26 μA , respectivamente, em t_p igual a 10 ms.

Assim, a otimização do parâmetro t_p foi realizada utilizando-se a melhor relação de I_{pa} e $w_{1/2}$ em função de t_p . Foi possível averiguar que o comportamento voltamétrico da tricaína frente à variação do t_p apresentou os melhores resultados em 2 ms, com I_{pa} de 391 μA e $w_{1/2}$ de 230 μA , para o pico I e, para o pico II, 15 μA e 22 μA , respectivamente.

5.5.4 Influência do incremento de varredura

Para este estudo, mantiveram-se constantes os parâmetros otimizados, v a 50 mV s^{-1} , A_p a 125 mV s^{-1} e t_p a 2ms, variando apenas I_p . Os voltamogramas obtidos podem ser observados na Figura 17.

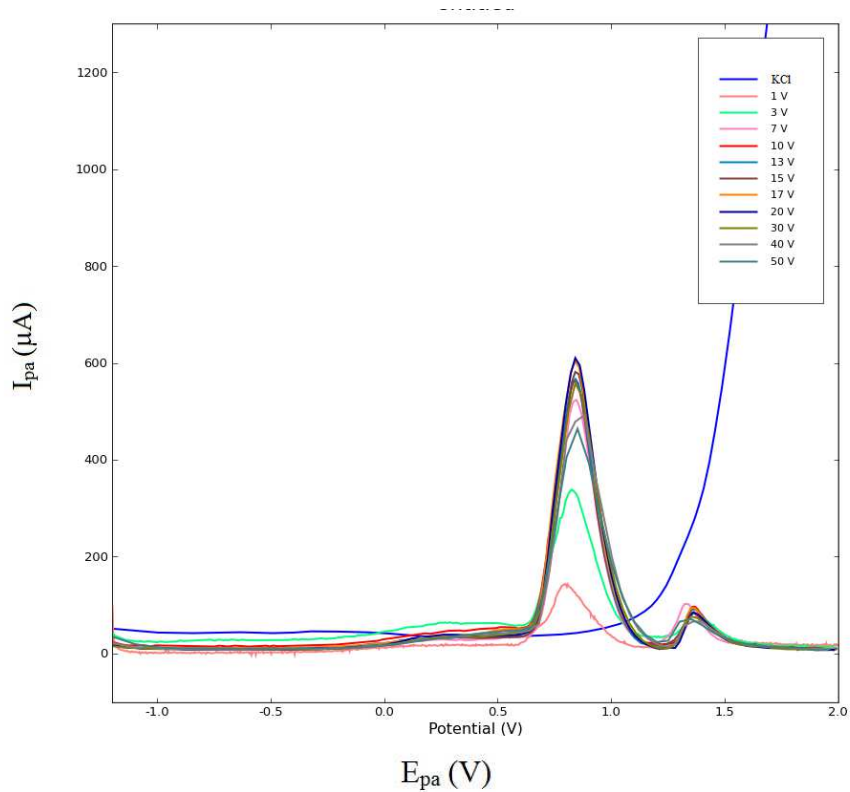


Figura 17 Voltamogramas da solução de uréia ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes I_p (1 a 50V), utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_p = 2 \text{ ms}$

Foi possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação de 0,8V (pico I) e 1,3V (pico II) vs. Ag|AgCl, (KCl_{sat}). Nos Gráficos 15 e 16 mostram-se I_{pa} e $w_{1/2}$, em função da variação de I_p .

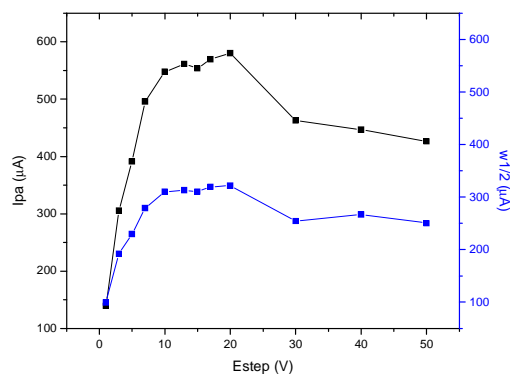


Gráfico 15 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p (1 a 50 V) utilizando DPV, para o pico I

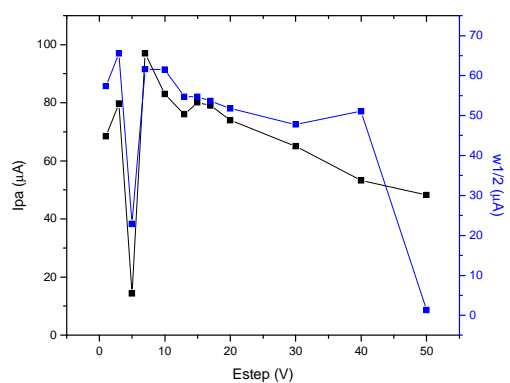


Gráfico 16 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p (1 a 50 V) utilizando DPV, para o pico II

Para o pico I, I_{pa} e $w_{1/2}$ aumentam proporcionalmente com o aumento de I_p , contudo, ao atingir I_p maiores que 20 V, I_{pa} e $w_{1/2}$ diminuem. Para o pico II foi possível observar que ocorrem variações durante todo o intervalo do incremento de varredura estudado, contudo, durante os potenciais iniciais apresentam maior

I_{pa} . Em consequência, $w_{1/2}$, nos potenciais seguintes, diminui proporcional ao aumento de I_p .

Para o pico I, a variação de I_{pa} máxima foi de 580 μA e $w_{1/2}$ de 321 μA , em I_p de 20 V. Já para o pico II, os valores obtidos foram de 96 μA e 61 μA , respectivamente, em I_p de 7 V.

Assim, a otimização do parâmetro incremento de varredura foi realizada utilizando-se a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$, em função de I_p . Foi possível averiguar que o comportamento voltamétrico da tricafina apresentou os melhores resultados em 20 V, com I_{pa} de 580 μA e $w_{1/2}$ de 321 μA , para o pico I e de 74 μA e 51 μA , para o pico II.

5.5.5 Otimização de parâmetros da voltametria de pulso diferencial

Após a análise univariada dos parâmetros estudados foi possível otimizar os parâmetros eletroquímicos utilizando a modalidade DPV. Assim, v foi mantida em 50 mV s^{-1} , A_p em 125 mV s^{-1} , t_p em 2 ms e I_p em 20 V e I_{pa} foi igual a 580 μA e $w_{1/2}$ igual a 321 μA , para o pico I e 74 μA e 51 μA , respectivamente, para o pico II.

5.6 Voltametria de onda quadrada

5.6.1 Influência da amplitude de pulso

Na modalidade de onda quadrada (SWV) foram otimizados a amplitude de pulso (A_p), a frequência (f) e o incremento de varredura (I_p) de forma univariada. Sendo assim, para o estudo de A_p foram mantidos constantes os valores de f e I_p em 10Hz e 5mV, respectivamente. Na Figura 18 mostram-se os voltamogramas obtidos.

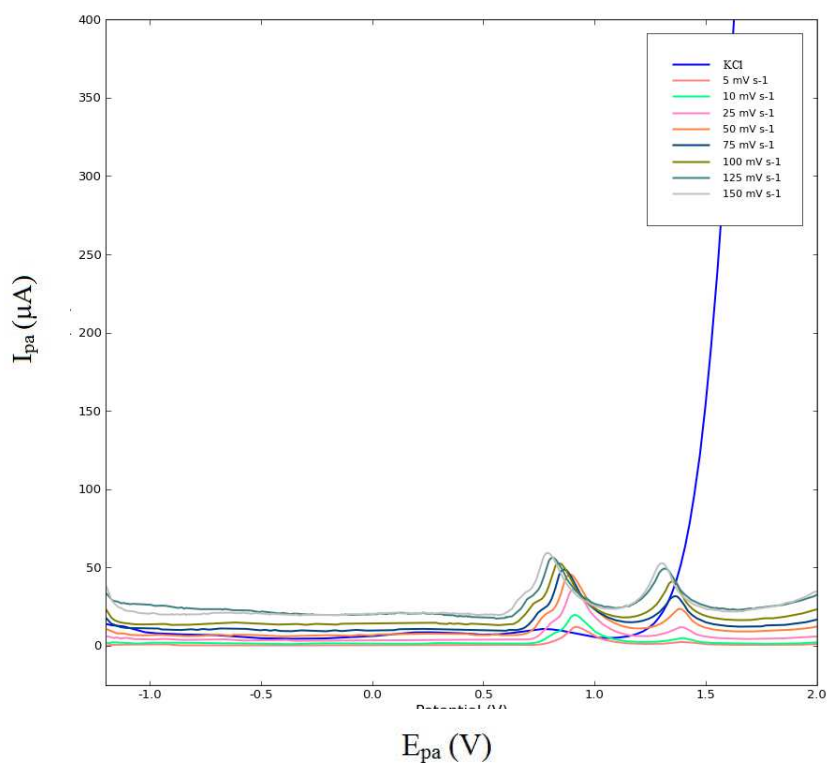


Figura 18 Voltamogramas da solução de tricafina ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes A_p (5 a 150 mV s^{-1}), utilizando voltametria de onda quadrada, $f = 10\text{Hz}$ e $I_p = 5\text{mV}$

Nos voltamogramas foi possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação de $0,8 \text{ V}$ (pico I) e $1,3 \text{ V}$ (pico II) vs. $\text{Ag}|\text{AgCl} (\text{KCl}_{\text{sat}})$, com deslocamento de E_p igual a $\pm 0,1 \text{ V}$ em A_p menores que 50 mV e maiores que 125 mV , para o pico I. Já para o pico II não houve deslocamento de E_p .

Os resultados podem ser analisados correlacionando I_{pa} e $w_{1/2}$ em função de A_p , como mostrado nos Gráficos 17 e 18.

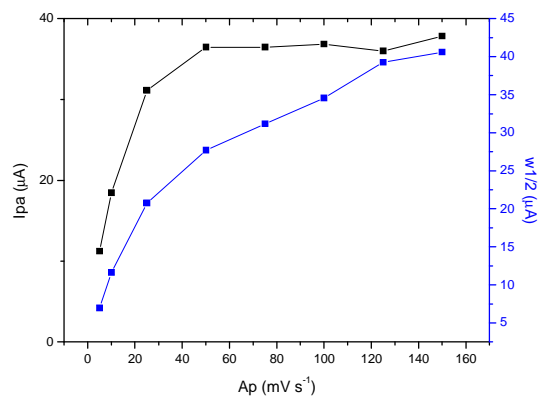


Gráfico 17 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de A_p (5 a 150 mV s^{-1}), utilizando SWV, para o pico I

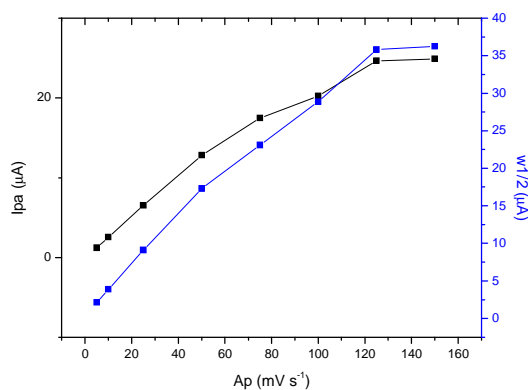


Gráfico 18 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de A_p (5 a 150 mV s^{-1}), utilizando SWV, para o pico II

Para ambos os picos foi possível observar que I_{pa} e $w_{1/2}$ aumentaram proporcionalmente ao aumento de A_p . Para o pico I, a variação de I_{pa} máxima é de $37 \mu\text{A}$ e $w_{1/2}$ é $40 \mu\text{A}$, em A_p igual a 150 mV . Para o pico II, a variação máxima de I_{pa} é de $24 \mu\text{A}$ e $w_{1/2}$ é de $36 \mu\text{A}$, em A_p igual a 150 mV .

Dessa forma, observando-se os voltamogramas obtidos e, ainda, o comportamento da tricaína nos gráficos construídos, foi utilizada, como critério de escolha para otimização de A_p , a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$. Foi possível otimizar A_p em 75 mV, com I_{pa} igual a 36 μA e $w_{1/2}$ igual 31 μA , para o pico I. Já para o pico II, I_{pa} foi de 17 μA e $w_{1/2}$ de 23 μA .

5.6.2 Influência da frequência

Para este estudo, manteve-se constante I_p em 5 mV e A_p otimizada em 75 mV s^{-1} e variou-se a f. Na Figura 19 mostram-se os voltamogramas obtidos.

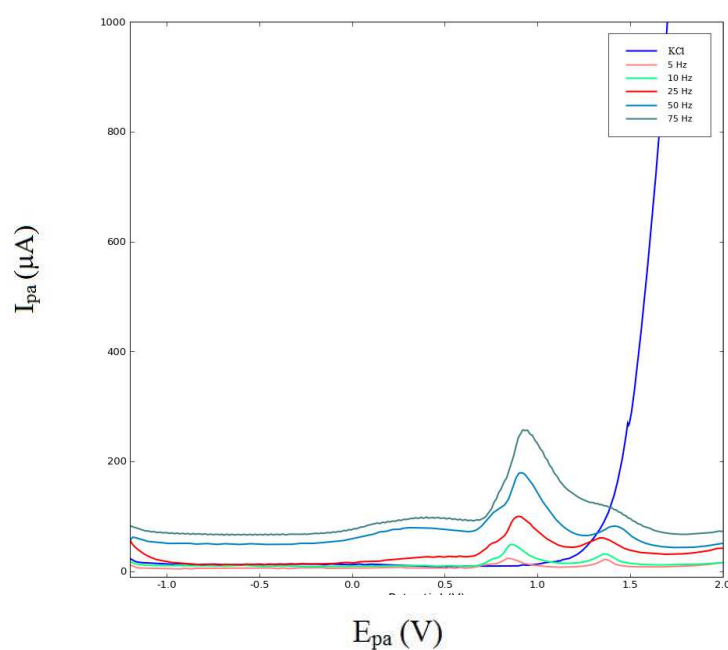


Figura 19 Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes f (5 a 75 Hz), utilizando SWV, $I_p = 5 \text{ mV}$ e $A_p = 75 \text{ mV s}^{-1}$

Nos voltamogramas obtidos foi possível observar a presença de dois picos anódicos, com potenciais de oxidação de 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II) vs. Ag|AgCl (KCl_{sat}), com deslocamento de E_p igual $\pm 0,1$ V, em f maior que 25 Hz, para ambos os picos.

Nas frequências maiores que 50 Hz não foi possível realizar a análise, pois ocorreu a sobreposição dos picos, impossibilitando a análise dos dados. Nos Gráficos 19 e 20 mostra-se a relação de I_{pa} e $w_{1/2}$, em função da variação de f .

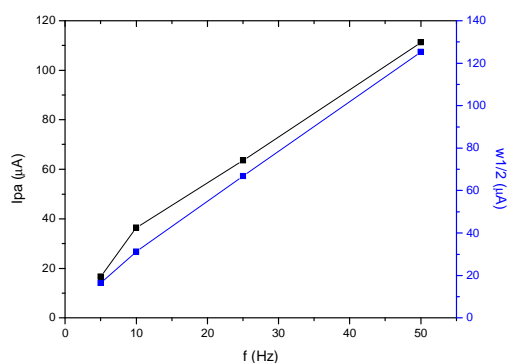


Gráfico 19 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de f (5 a 75 Hz) utilizando SWV, para o pico I

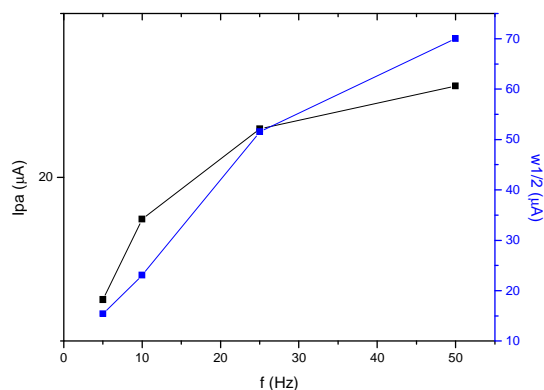


Gráfico 20 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de f (5 a 75 Hz), utilizando SWV, para o pico II

Para ambos os picos foi possível observar que I_{pa} e $w_{1/2}$ aumentaram proporcionalmente com a f . Para o pico I, a variação de I_{pa} máxima foi de $111 \mu\text{A}$ e $w_{1/2}$ foi de $125 \mu\text{A}$ em f igual a 50 Hz. Já para o pico II, os valores obtidos foram de $25 \mu\text{A}$ e $70 \mu\text{A}$, respectivamente, também em f igual a 50Hz.

Os melhores resultados apresentados durante o estudo do comportamento voltamétrico da tricaína frente à variação de f , para ambos os casos, foi em 50 Hz, por apresentar a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$.

5.6.3 Influência do incremento de varredura

Para este estudo, mantiveram-se constantes os parâmetros otimizados, A_p em 75 mV e f em 50 Hz, variando I_p . Na Figura 20 mostram-se os voltamogramas obtidos.

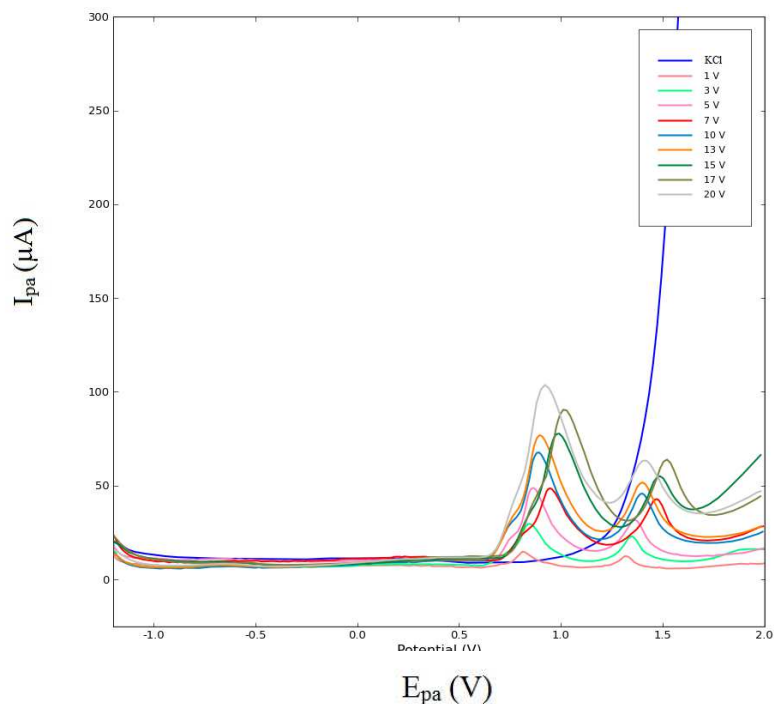


Figura 20 Voltamogramas da solução de uracina ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes I_p (1 a 20 V), utilizando SWV, $A_p = 75 \text{ mV s}^{-1}$ e $f = 50 \text{ Hz}$

Nos voltamogramas obtidos foi possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação de 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II) vs. Ag|AgCl (KCl_{sat}), com deslocamento de E_p igual $\pm 0,2 \text{ V}$ em I_p acima de 13 V.

Nos Gráficos 21 e 22 mostra-se a relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$, em função de I_p .

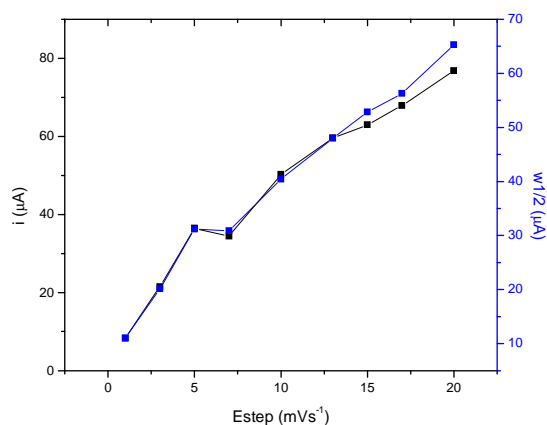


Gráfico 21 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p (1 a 20 V) utilizando SWV, para o pico I

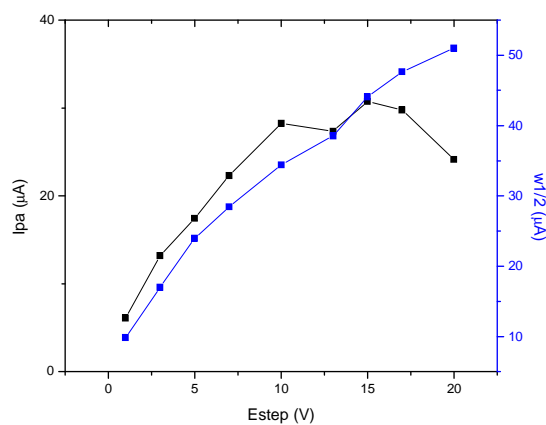


Gráfico 22 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função de I_p (1 a 20 V) utilizando SWV, para o pico II

Para ambos os picos, I_{pa} e $w_{1/2}$ aumentaram proporcionalmente com o aumento de I_p . Para o pico I foi possível observar uma variação da I_{pa} e $w_{1/2}$ em I_p igual a 7 V. Igualmente, para o pico II ocorreu uma variação em I_p de 13 V.

Para o pico I, a variação de I_{pa} máxima foi de 77 μA e $w_{1/2}$ de 65 μA em I_p igual a 20 V. Para o pico II, os valores obtidos foram de 31 μA e 44 μA , respectivamente, em I_p igual a 15 V.

A otimização de I_p foi realizada utilizando-se a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$ em função de I_p . Dessa forma, o comportamento voltamétrico da tricaína frente à variação de I_p apresentou os melhores resultados em 17 V, com I_{pa} igual a 68 μA e $w_{1/2}$ igual a 56 μA , para o pico I e, para o pico II, 29 μA e 47 μA , respectivamente.

5.6.4 Otimização de parâmetros da voltametria de onda quadrada

Após a análise univariada dos parâmetros estudados foi possível otimizar a modalidade onda quadrada. Assim, A_p foi mantida em 75 mV s^{-1} , f em 10 Hz e o I_p em 17 V. A variação final de I_{pa} foi de 68 μA e $w_{1/2}$ de 56 μA , para o pico I, e 29 μA e 47 μA , para o pico II.

5.7 Comparação entre as modalidades voltamétricas

Na Tabela 3 mostram-se as comparações dos principais parâmetros das modalidades LSV, DPV e SWV. É possível observar que a modalidade DPV mostrou-se mais sensível que LSV e SWV, para a quantificação da tricaína, por apresentar melhores valores de I_{pa} .

Tabela 3 Comparação entre as modalidades varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada

	LSV	DPV	SWV
	Pico I	Pico I	Pico I
I_{pa}	26 μ A	580 μ A	68 μ A
W_{1/2}	19 μ A	321 μ A	56 μ A
	Pico II	Pico II	Pico II
I_{pa}	8 μ A	74 μ A	29 μ A
W_{1/2}	17 μ A	51 μ A	47 μ A

Em relação à Tabela 3, a modalidade DPV foi 22 vezes mais sensível que a modalidade LSV e 8,5 vezes mais sensível que a modalidade SWV, para o pico I, enquanto, para o pico II, a modalidade DPV foi 9 vezes mais sensível que a LSV e 2,5 vezes mais sensível que a modalidade SWV. Sendo assim, para a quantificação da tricaína, a utilização da DPV apresentou-se mais vantajosa que a utilização da LSV e SWV.

5.8 Estudo de pré-concentração na modalidade pulso diferencial

Após a otimização dos parâmetros das modalidades voltamétricas, e visto que a DPV apresentou maiores valores de I_{pa} , foi utilizada esta modalidade voltamétrica para a quantificação de tricaína em filés de tilápia. Porém, antes da quantificação, foi realizado um estudo de pré-concentração, para observar o comportamento da tricaína mediante o potencial e o tempo de depósito.

5.8.1 Influência do potencial de depósito

Foram utilizados todos os parâmetros otimizados na modalidade DPV e foi fixado, inicialmente, o tempo de depósito em 60 segundos e o potencial de depósito foi variado. Na Figura 21 mostram-se os voltamogramas obtidos.

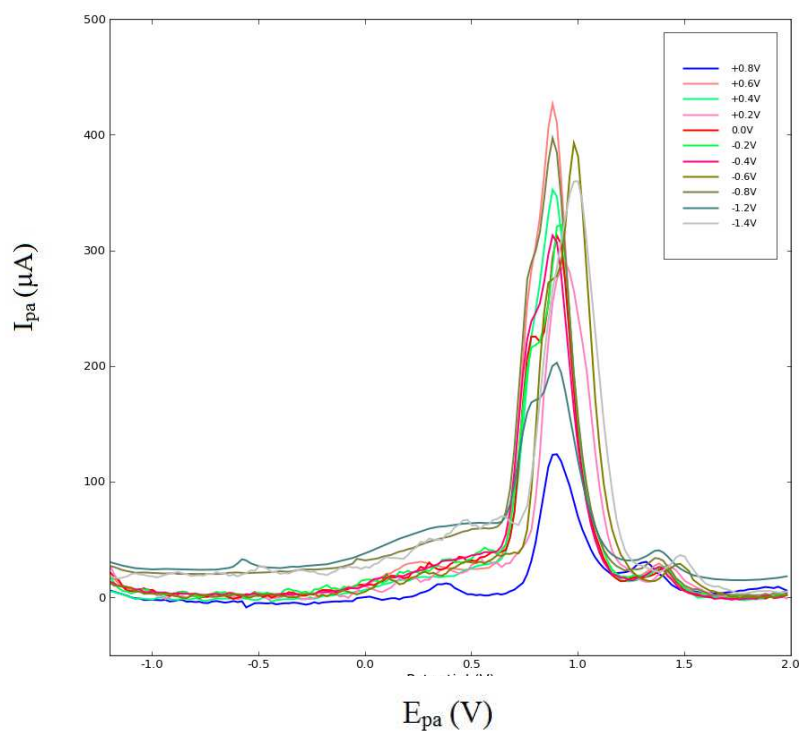


Figura 21 Voltamogramas da solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes E_d (+0,8V a -1,4V), utilizando DPV, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$ e $I_p = 20 \text{ V}$

Nos voltamogramas obtidos é possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação de 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II) vs.

Ag|AgCl (KCl_{sat}), com deslocamento de E_p igual a $\pm 0,1$ V, entre os potenciais estudados. Nos Gráficos 23 e 24 mostra-se a relação de I_{pa} e $w_{1/2}$, em função da variação do potencial de depósito.

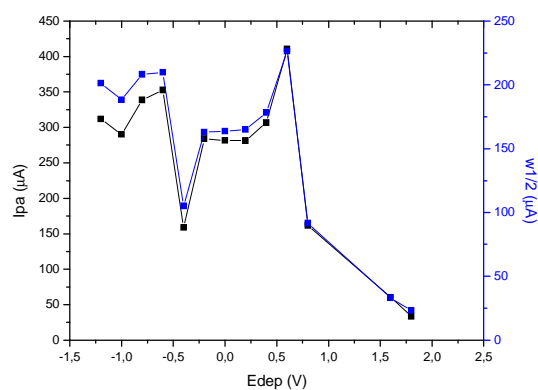


Gráfico 23 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em KCl 0,5 mol L⁻¹, em função de E_p (+0,8 V a -1,4 V), utilizando DPV, para o pico I

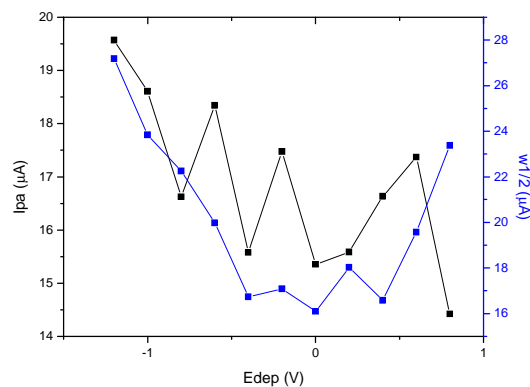


Gráfico 24 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em KCl 0,5 mol L⁻¹, em função de E_p (+0,8 V a -1,4 V), utilizando DPV, para o pico II.

Para ambos os picos, I_{pa} e $w_{1/2}$ não apresentam comportamento proporcional, ou seja, foi observada variação em todos os potenciais de depósito estudados.

Para o pico I, a variação de I_{pa} máxima foi de 410 μA e $w_{1/2}$ foi de 226 μA , no potencial de depósito de 0,6 V. No pico II, os valores obtidos foram de 19 μA e 27 μA , respectivamente, no potencial de depósito de -1,2 V.

Na otimização do potencial de depósito para o estudo de pré-concentração foi utilizada a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$, em função do potencial de depósito e também foi considerado o potencial de depósito que apresentou menor ruído entre as análises. Assim, o comportamento voltamétrico da tricaína frente à variação do potencial de depósito apresentou os melhores resultados em -0,6 V, com I_{pa} igual a 352 μA e $w_{1/2}$ igual a 209 μA , para o pico I e 18 μA e 19 μA , respectivamente, para o pico II.

5.8.2 Influência do tempo de depósito

Utilizando todos os parâmetros otimizados na modalidade DPV, o potencial de depósito foi fixado em -0,6 V e o tempo de depósito variou. Na Figura 22 mostram-se os voltamogramas obtidos.

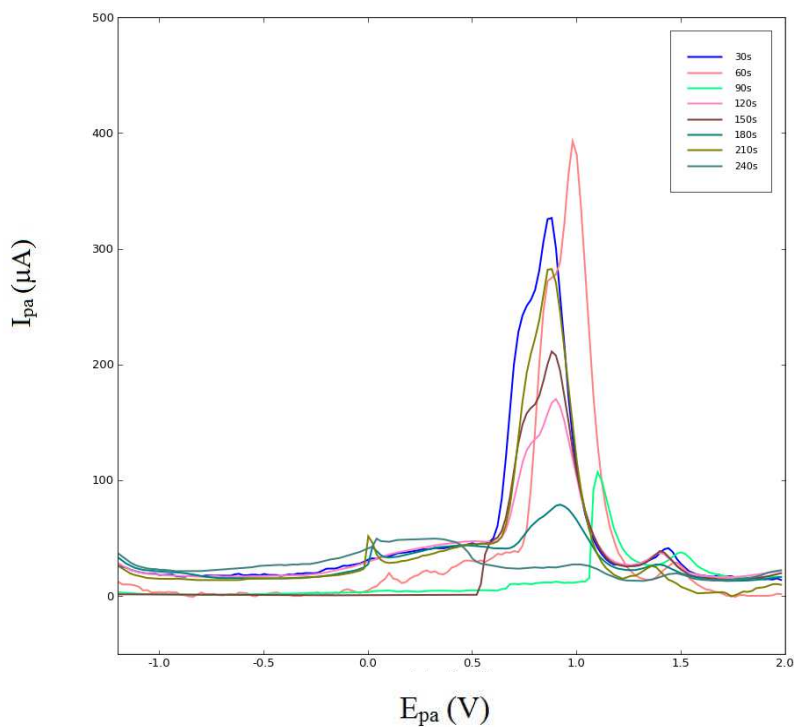


Figura 22 Voltamogramas da solução de tricafina ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes t_d (30 a 240s), utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$ e $E_d = -0,6\text{V}$

Nos voltamogramas obtidos é possível observar a presença de dois picos anódicos com potenciais de oxidação 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II) vs. Ag|AgCl (KCl_{sat}), com deslocamento de E_p igual a $\pm 0,1 \text{ V}$, entre os tempos de depósito estudados. Nos Gráficos 25 e 26 mostra-se a relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$, em função da variação do t_p .

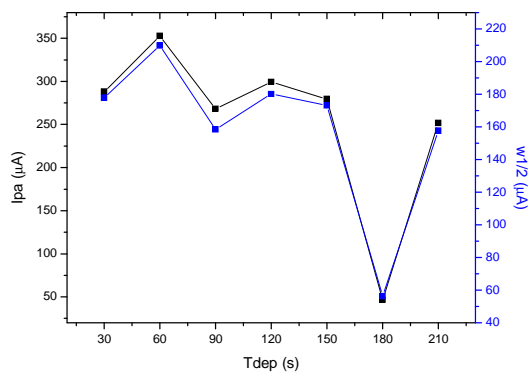


Gráfico 25 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_d (30 a 240s), utilizando DPV, para o pico I

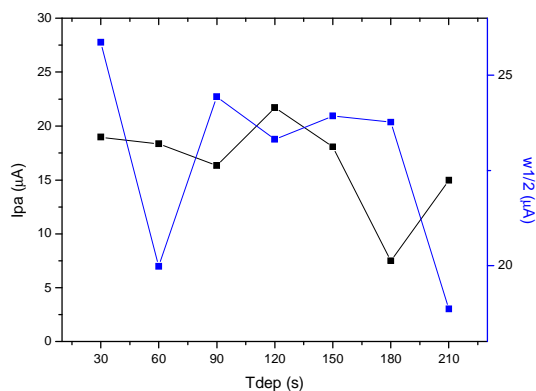


Gráfico 26 Variação de I_{pa} e $w_{1/2}$ de uma solução de tricaína ($3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em função do t_d (30 a 240s), utilizando DPV, para o pico II

Para ambos os picos, I_{pa} e $w_{1/2}$ não apresentaram comportamento proporcional, ou seja, foi observada uma variação em todos os tempos de depósito estudados.

Para o pico I, a variação de I_{pa} máxima foi de 352 μA e $w_{1/2}$ de 209 μA , no tempo de depósito de 60 segundos. Para o pico II, os valores obtidos foram de 21 μA e 23 μA , respectivamente, no tempo de depósito de 120 segundos.

Na otimização do tempo de depósito no estudo de pré-concentração foi utilizada a melhor relação entre I_{pa} e $w_{1/2}$, em função do tempo de depósito. Dessa forma, o comportamento voltamétrico da tricaína frente à variação do tempo de depósito apresentou os melhores resultados em 120 segundos, com I_{pa} de 300 μA e $w_{1/2}$ de 180 μA , para o pico I e de 21 μA e 23 μA , respectivamente, para o pico II.

5.8.3 Otimização de parâmetros da pré-concentração da tricaína na modalidade DPV

Após a análise univariada dos parâmetros estudados foi possível otimizar e analisar os resultados dos estudos de pré-concentração. Assim, o potencial de depósito escolhido foi de -0,6 μA e o tempo de depósito foi de 120 segundos, com I_{pa} igual a 300 μA e $w_{1/2}$ igual a 180 μA , para o pico I e 21 μA e 23 μA , respectivamente, para o pico II. Na Tabela 4 é possível observar a comparação de I_{pa} na presença e na ausência da pré-concentração.

Tabela 4 Comparação de I_{pa} na presença e na ausência da pré-concentração

	Sem pré-concentração	Com pré-concentração
	Pico I	Pico I
I_{pa}	580 μA	300 μA
$W_{1/2}$	321 μA	180 μA
	Pico II	Pico II
I_{pa}	74 μA	21 μA
$W_{1/2}$	51 μA	23 μA

Analisando-se os dados da Tabela 3 é possível afirmar que a pré-concentração não foi eficiente para a tricaína, visto que, para o pico I, ocorreu uma queda de 48% no valor de I_{pa} e de 71%, para o pico II. Para a quantificação da tricaína em filé de peixe, as análises foram realizadas sem a utilização da pré-concentração.

5.9 Análise da tricaína na ausência de matriz

Para esta análise, foi construída uma curva analítica utilizando-se o eletrólito de suporte KCl 0,5 mol L⁻¹ com adições sucessivas de diferentes concentrações de tricaína, na modalidade pulso diferencial, em que v foi mantida em 50 mV s⁻¹, A_p em 125 mV s⁻¹, t_p em 2 ms e I_p em 20 V. Apenas o pico I apresentou resposta no potencial de 0,8 V, sendo utilizado para todo o estudo das concentrações. Foi possível verificar que a ausência do pico II se deve ao fato de este ter menor corrente que o pico I, não sendo possível visualizá-lo em baixas concentrações. Para a determinação e a quantificação da tricaína, utilizou-se regressão linear, por meio da equação da reta, analisando a variação de I_{pa} em

função da concentração de tricaína. Na Figura 23 mostram-se os voltamogramas e a curva analítica obtidos.

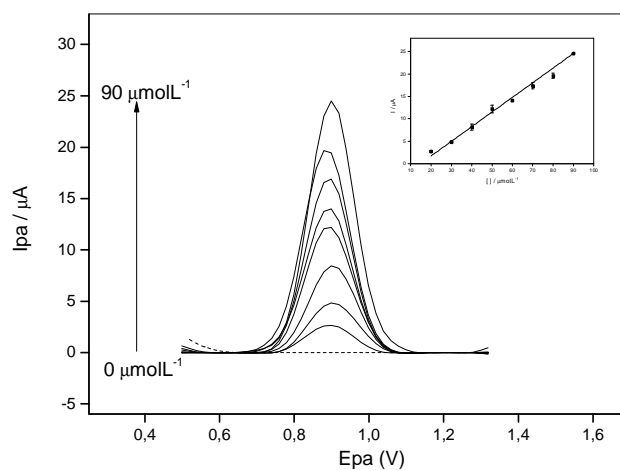


Figura 23 Voltamogramas de adições sucessivas de solução de tricaína em diferentes concentrações (20 a 90 μmol L⁻¹), utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$

A partir da Figura 23 é possível destacar alguns parâmetros analíticos obtidos com o método eletroquímico, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 Parâmetros analíticos obtidos pela variação de I_{pa} em função de diferentes concentrações de tricaína na modalidade DPV

Linearidade	20 a 90 μmol L ⁻¹
Equação da reta	$I_p (\mu A) = 3,26644 \times 10^{-7} x + 4,80589 \times 10^{-6}$
Coefficiente de correlação (R)	0,99934
Limite de detecção (LD)	2,7 μmol L ⁻¹
Limite de quantificação (LQ)	8,2 μmol L ⁻¹
CV	2,67%

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade do analito presente em uma amostra detectável. Foi aplicado o método com base em parâmetros da curva analítica (Equação 2). O LD corresponde à concentração de uma substância que fornece um sinal igual a 3 vezes a razão s/a , em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta, obtido a partir do coeficiente linear da equação e a é a inclinação ou o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

$$LD = 3 \times \frac{s}{a} \quad \text{(Equação 2)}$$

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade do analito em uma determinada amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão. O LQ corresponde a uma relação de 10 vezes a razão s/a , em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta, obtido pela estimativa coeficiente linear da equação e a é a inclinação ou o coeficiente angular da curva analítica (Equação 3) (BARROS, 2002).

$$LQ = 10 \times \frac{s}{a} \quad \text{(Equação 3)}$$

5.10 Análise de tricáína nos extratos de filé de peixe

Foi realizada a análise da tricaína nos extratos de filé de tilápia obtidos pelos dois métodos de extração propostos, utilizando a modalidade DPV com as condições otimizadas.

Na Figura 24 mostram-se os voltamogramas obtidos da solução de eletrólito de suporte KCl 0,5 mol L⁻¹ e a solução de eletrólito de suporte contendo 1 mL do extrato de peixe obtido pelos métodos I e II, sem a presença da tricaína.

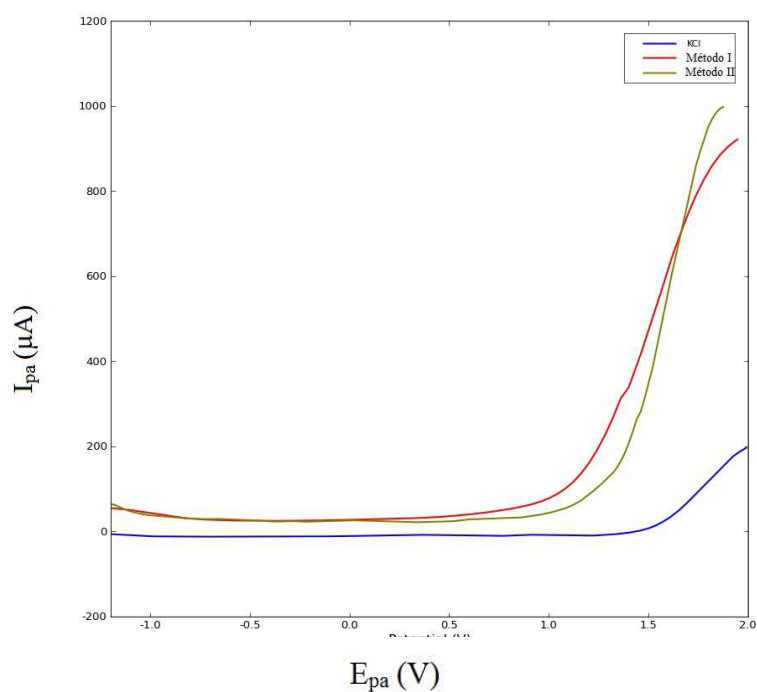


Figura 24 Voltamogramas da solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ na ausência e na presença de 1 mL do extrato de filé de peixe obtido pelo métodos I e II, utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$

Foi possível observar que nenhum voltamograma apresentou pico, o que evidencia a ausência de possíveis interferentes para a realização da análise.

Para observar o comportamento voltamétrico da tricaína na presença dos extratos obtidos, foi realizado um estudo de concentração da tricaína na presença dos extratos obtidos pelos métodos I e II. Nas Figuras 25 e 26 mostram-se os voltamogramas obtidos.

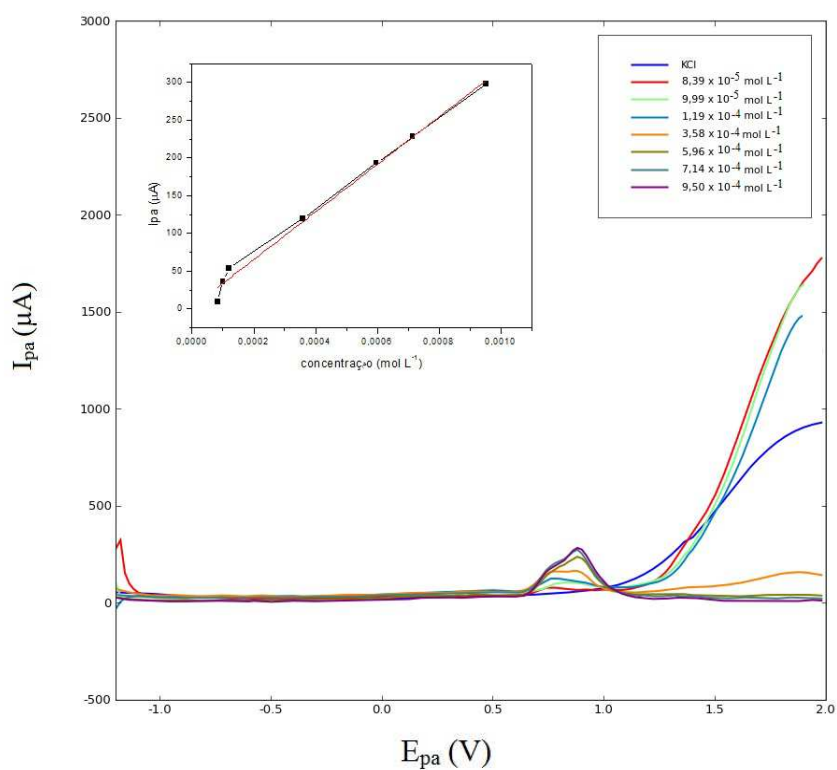


Figura 25 Voltamogramas da solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ na presença de 1 mL do extrato de filé de peixe obtido pelo método I, em diferentes concentrações de tricaína, utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$

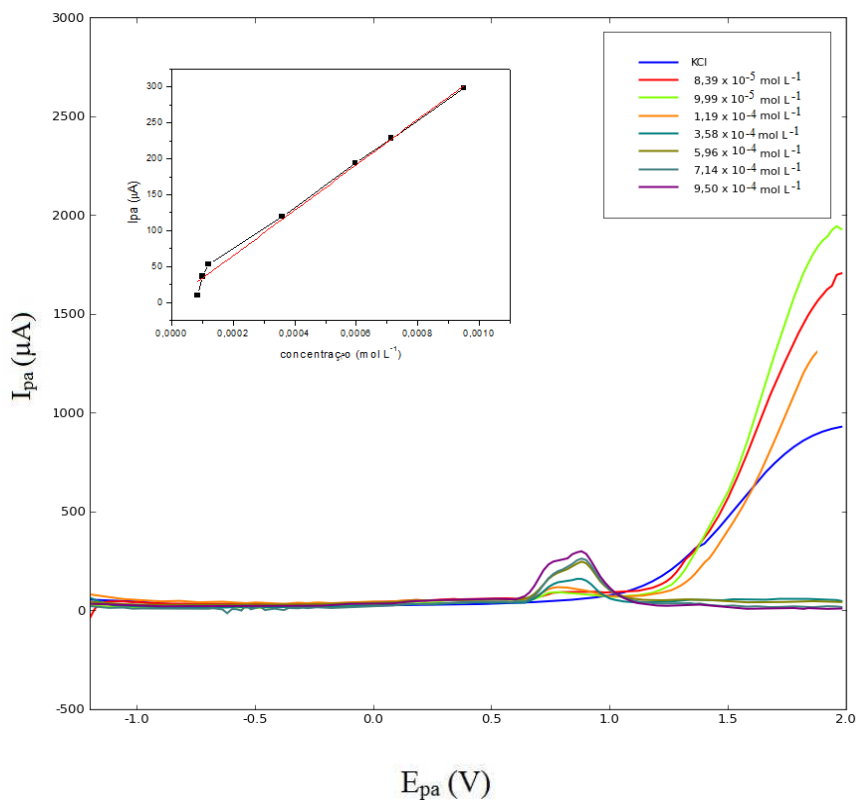


Figura 26 Voltamogramas da solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de 1 mL do extrato de filé de peixe obtido pelo método II, em diferentes concentrações de tricaina, utilizando DPV, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $A_p = 125 \text{ mV s}^{-1}$, $t_p = 2 \text{ ms}$, $I_p = 20 \text{ V}$

Foi possível observar que as curvas apresentam a mesma sensibilidade que a curva analítica na ausência da matriz. Para os extratos utilizando o método I, o coeficiente de correlação foi de 0,9959 e, para os extratos utilizando o método II, foi de 0,9899.

5.11 Ensaio de recuperação

Para os ensaios de recuperação foi realizada a fortificação no filé de peixe com a adição de 200 μL , 300 μL e 500 μL de tricaína ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), separadamente. Em seguida, foi realizada a extração da tricaína pelos métodos I e II. As leituras voltamétricas foram realizadas na modalidade pulso diferencial, com os parâmetros fixados em v (50 mV s^{-1}), A_p (125 mV s^{-1}), t_p (2 ms) e I_p (20 V). Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6. Todas as medidas voltamétricas podem ser observadas no Anexo I.

Tabela 6 Ensaio de recuperação dos métodos de extração I e II da tricaína

	Adicionado 300 μL	Adicionado 200 μL	Adicionado 500 μL	% Recuperação
Método I	15,42 μA	7,74 μA	24,58 μA	106,13%
Método II	35,28 μA	21,12 μA	37,95 μA	67,29%

É possível observar, na Tabela 6, que o método I apresentou maior porcentagem de recuperação que o método II, mostrando-se mais sensível e seletiva a análise do anestésico tricaína. Isso pode ser devido ao fato de que, no método I, foi utilizada uma solução extratora contendo tampão McIlvaine e metanol (pH 4,4), o qual mantém a solução ácida, protonando os grupos amino e metanosulfonado do anestésico tricaína. E, ainda, pelo fato de o método I utilizar a trituração para o processo de extração, aumentando a superfície do contato do filé de peixe com o anestésico, enquanto no método II utilizou-se apenas agitação.

6 CONCLUSÃO

Foi possível o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação e a quantificação da tricaína em filé de tilápia.

A tricaína apresentou comportamento de oxidação irreversível com dois picos anódicos em 0,8 V (pico I) e 1,3 V (pico II). O processo de transferência de massa foi controlado por difusão com ocorrência de reações químicas sem complicações cinéticas.

A melhor relação de I_{pa} e $w_{1/2}$ foi obtida com a modalidade pulso diferencial, registrando 580 μA e 321 μA , respectivamente, para o pico I e, para o pico II, 74 μA e 51 μA .

O método I apresentou maior eficiência na extração da tricaína em filé de peixe, com recuperação de 106, 13%.

Para a quantificação da tricaína, o método apresentou limite de detecção de 2,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação de 8,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9993.

REFERÊNCIAS

ACERETE, L. et al. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1-4, p. 167-178, Aug. 2004.

ARAÚJO, D. R.; PAULA, E. de; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, 1775-1783, 2008.

ARTEAGA, J. F. et al. comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 5, p. 5126-5138, May 2012.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

BARRETO, R. E. et al. MS222 does not induce primary DNA damage in fish. **Aquaculture International**, London, v. 15, n. 2, p. 163-168, Apr. 2007.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BELIK, W. Perspectivas para segurança alimentar e nutricional no Brasil. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 12-20, jan./jun. 2003.

BERNSTEIN, P. S.; DIGRE, K. B.; CREEL, D. J. Retinal toxicity associated with occupational exposure to the Fish anaesthetic MS-222. **American journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 124, n. 6, p. 843-844, Dec. 1997.

BOKROS, J. C. Carbon biomedical devices. **Carbon**, Elmsford, v. 15, n. 6, p. 355-371, 1977.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing**. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 2005. Disponível em: <<http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2011.

DAVIS, M. W. et al. Health the effect of tricaine on use of the fluorescein test for detecting skin and corneal ulcers in fish. **Journal of Aquatic Animal**, Bethesda, v. 20, n. 2, p. 86-95, June 2008.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Food safety and quality**. Rome: FAO, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/empres-food-safety/en/>>. Acesso em: 16 fev. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. 4. ed. Flórida: Department of Health and Human Services, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/UCM251970.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2013.

FRISCH, A. J.; ANDERSON, T. A. The response of coral trout (*Plectropomusleopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 23-34, July 2000.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 1136–1142, Apr. 2004.

KIESSLING, A. et al. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated atlantic salmon (*Salmosalar*) following bath administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 286, n. 3-4, p. 301–308, Jan. 2009.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S™ from the edible tissue of silver perch (*Bidyanusbidyanus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1-4, p. 265–277, Apr. 2004.

KOUNAVES, S. P. Voltametric techniques. In. SETTLE, F.A. (Ed.). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1997. p. 719-720.

LAW, H. D. Electrolytic reduction: part VII: the catalytic action of copper. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 101, p. 1544-1552, 1912.

LINDEN, W. E. V. D.; DIEKER, J. W. Glasy-carbon as electrode material in electroanalytical chemistry. **Anaytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 1-24, Sept. 1980.

MEINERTZ, J. R. et al. Liquid chromatographic determination of benzocaine and N-acetylbenzocaine in the edible fillet tissue from rainbow trout. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 855, n. 1, p. 255–260, Sept. 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de legislação:** programas nacionais de saúde animal do Brasil. Brasília: MAPA, 2009.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Acordo de cooperação técnica. **Ministério da Pesca e Aquicultura**, Brasília, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controlempa/saude-pesqueira/acordo-de-cooperacao-tecnica-mpa-mapa>>. Acesso em: 26 dez. 2012.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Cartilha do pescador e aquicultor. **Ministério da Pesca e Aquicultura**, Brasília, mar. 2013. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Outros/Cartilha_pescador_aqui\(final\)SEp.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Outros/Cartilha_pescador_aqui(final)SEp.pdf)>. Acesso em: 16 fev. 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatística da Pesca e Aquicultura**. Brasília: MPA, 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc>. Acesso em: 12 fev. 2014.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. Brasília: MPA, 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatico-da-pesca-e-aquicultura-2010>>. Acesso em: 17 dez. 2012.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas:** texto e atlas colorido. 5. ed. ampl. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MEINERTZ, J. R. et al. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S (™) at different temperatures, durations, and concentrations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 254, p. 347–354, 2006.

MEINERTZ, J. R.; SCHREIER, T. M. Depletion of isoeugenol residues from the fillet tissue of AQUI-STM exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, n. 3-4, p. 200-206, 2009.

MELLES, D. et al. In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, n. 15, 913– 914, Jan. 2013.

METTAM, J. J. et al. The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 133, n. 3-4, p. 265-274, Sept. 2011.

MYLONAS C. C. et al. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1-4, p. 467-481, May 2005.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 4, p. 706-723, 1964.

OHR, E. A. Tricaine methanesulphonate--I .Ph and its effects on anesthetic potency *. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: comparative pharmacology**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 13-17, 1976.

PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p.516-537, 2013.

REDDY, T. M.; BALAJI, K.; REDDY, S. R. J. Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of benzocaine and butacaine with nafion modified glassy carbon electrode. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 79, n. 2, p. 253-259, July 2006.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008.

RUANE, N. M.; CARBALLO, E. C.; KOMEN, J. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). **Aquaculture Research**, Washington, v. 33, n. 10, p. 777-784, Aug. 2002.

SCHERPENISSE, P.; BERGWERFF, A. A. Determination of residues of tricaine in fish using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 586, n. 1-2, p. 407-410, Mar. 2007.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Aquicultura e pesca: tilápias**. São Paulo: Sebrae, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SNEDDON, L. U. Pain perception in fish: indicators and endpoints. **ILAR journal**, Washington, v. 50, n. 4, p. 338-42, 2009.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 32-43, Jan. 2012.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

STEHLY, G. R. et al. Effects of temperature on the loss of benzocaine and acetylated benzocaine residues from edible tissues of channel catfish *Ictalurus punctatus*. Silver Spring: Food and Drug Administration, 1995.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 121–127, Apr. 1998.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effects of temperature on the elimination of benzocaine and acetylated benzocaine residues from the edible fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 5, p. 387-392, May 2000.

SUN, Y.-X. et al. Tissue distribution and elimination of florfenicol in crucian carp (*Carassius auratus cuvieri*) after a single dose intramuscular or oral administration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 309, n. 1-4, p. 82-85, Jan. 2010.

TICIANELLI, E. A.; GONZALES, E. R. **Eletroquímica: princípios e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Edusp, 2005.

VELISEK, J. et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 310, n. 3-4, p. 369-375, Jan. 2011.

VERA, L. M. et al. MS-222 toxicity in juvenile sea bream correlates with diurnal activity, as measured by a novel video-tracking method. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1-2, p. 29-34, Sept. 2010.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 2. ed. New Jersey: Wiley-VCH, 2006.

WEBER, R. A. et al. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, n. 1-2, p. 147–150, Mar. 2009.

WEBER, R. A. et al. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 321, n. 1-2, p. 108-112, Nov. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety. Oxford: WHO, 2013.
Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/en/>>. Acesso em: 16 fev. 2013.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 201-18, Feb. 2012.

ANEXOS

Anexo I Valores de corrente para os extratos obtidos a partir de extração utilizando Métodos I e II

Método	Quantidade		I _{pa} (μA)
I	300μL	1ª Extração	10,42
		Repetição 1	5,00
		Repetição 2	0,00
		Repetição 3	0,00
		Total extração	15,42
I	200μL	1ª extração	4,18
		Repetição 1	3,56
		Repetição 2	0,00
		Repetição 3	0,00
		Total extração	7,74
I	500μL	1ª extração	20,46
		Repetição 1	4,12
		Repetição 2	0,00
		Repetição 3	0,00
		Total extração	24,58
II	300μL	1ª extração	23,29
		Repetição 1	11,99
		Repetição 2	0,00
		Repetição 3	0,00
		Total extração	35,28
II	200μL	1ª extração	19,12
		Repetição 1	2,00
		Repetição 2	0,00
		Repetição 3	0,00
		Total extração	21,12
II	500μL	1ª extração	23,87
		Repetição 1	14,08
		Repetição 2	0,00
		Repetição 3	0,00
		Total extração	37,95