



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Avaliação e caracterização eletroquímica de filmes de extrato do  
urucum (*Bixa orellana L.*) em meio aquoso.**

DAYRINE CRISTINA DE OLIVEIRA CABRAL

Recife

2023

DAYRINE CRISTINA DE OLIVEIRA CABRAL

**Avaliação e caracterização eletroquímica de filmes de extrato do urucum (*Bixa orellana L.*) em meio aquoso.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química.

**Área de concentração:** Físico-química.

**Orientador:** Flamarion Borges Diniz

Recife

2023

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Nataly Soares Leite Moro, CRB4-1722

C117a Cabral, Dayrine Cristina de Oliveira  
Avaliação e caracterização eletroquímica de filmes de extrato do urucum  
(*Bixa orellana L.*) em meio aquoso / Dayrine Cristina de Oliveira Cabral. – 2023.  
130 f.: il., fig., tab.

Orientador: Flamarion Borges Diniz.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN,  
Química, Recife, 2023.  
Inclui referências.

1. Físico-química. 2. Produtos naturais. 3. Urucum. I. Diniz, Flamarion  
Borges (orientador). II. Título.

541.3                      CDD (23. ed.)                      UFPE- CCEN 2023 - 72

# **DAYRINE CRISTINA DE OLIVEIRA CABRAL**

## **“AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE FILMES DE EXTRATO DO URUCUM (*BIXA ORELLANA L.*) EM MEIO AQUOSO.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química.

**Área de concentração:** Físico-química

Aprovada em: 24/02/2023

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Flamarion Borges Diniz (Orientador)**  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. Eduardo Henrique Lago Falcão**  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Dr. Rogério Tavares Ribeiro**  
Consultoria em Materiais e Inovação Tecnológica

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda proteção e força.

A Valquíria, minha mãe, a pessoa mais inteligente que eu conheço e que me inspira todos os dias a ser forte. Você é o exemplo de mulher e ser humano que eu busco me tornar. Você é minha fortaleza.

Ao Thiago, meu amor, por me dar todo o apoio, companheirismo e acolhimento necessários para concluir mais essa etapa da minha vida, eu sempre vou ser grata pela sorte de ter sua companhia durante esse processo. Obrigada por me confortar todas as muitas vezes que precisei e por me colocar pra dormir todas as vezes que o cansaço me fez querer desistir. Você foi a melhor escolha que eu já fiz na vida.

Aos meus amigos Karla, Adriana e Otávio por serem a melhor coisa que esses anos de universidade me proporcionaram. Ter a companhia de vocês tornou essa trajetória muito mais leve e divertida, mas acima disso, nos fez criar um vínculo para vida toda. Vocês são pessoas incríveis e eu tenho muito orgulho da nossa amizade.

Ao meu orientador Flamarion pelo suporte e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao DQF e ao LEEM pelo espaço fornecido para o desenvolvimento deste trabalho. Aos departamentos de física da UFPE, de química da UFRPE e ao PPG-Materiais da UFPE pelo suporte na realização das caracterizações espectroscópicas e a CAPES pela bolsa fornecida durante o desenvolvimento deste estudo.

*“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza. - Marie Curie.”*

**Curie Labouisse (2001, p 341).**

## RESUMO

A eletroquímica tem sido uma valiosa ferramenta na análise e caracterização de produtos naturais. Isso porque, boa parte dos componentes ativos desses produtos possuem grupos funcionais capazes de sofrer processos de oxidação ou redução eletroquímica. O urucum (*Bixa orellana L.*) é um composto amplamente utilizado pela indústria alimentícia como corante natural e possui como principal pigmento o carotenoide bixina. A caracterização espectroscópica das sementes e extratos de urucum confirmou a presença de bixina como componente principal. A atividade eletroquímica do urucum foi avaliada em meio aquoso através da evaporação dos seus extratos (drop-casting) na superfície de diferentes eletrodos. Três espécies eletroativas foram detectadas e o comportamento eletroquímico dessas substâncias mostrou ser sensível ao eletrodo de trabalho usado e ao tipo de tratamento dado à sua superfície. A oxidação eletroquímica da bixina foi identificada entre 0,7 e 1,2 V. Essa oxidação ocorre de forma irreversível e é afetada por transporte de massa de prótons em solução quando os extratos em superfície são avaliados em baixas velocidades de varredura. A oxidação da bixina apresentou coeficientes de transferência entre 0,72 e 0,86 dependendo do extrato ou eletrodo de trabalho usado indicando que o mecanismo de oxidação do extrato ocorre de forma semelhante em todas as superfícies. A avaliação de filmes oxidados de extrato de urucum em superfície de ouro por espectroscopia Raman indica que a oxidação eletroquímica da bixina promove alterações na insaturação da sua cadeia carbônica e envolve a participação do substituinte éster presente em uma de suas extremidades, sugerindo que o processo de oxidação converte bixina em norbixina. A comparação do índice eletroquímico da bixina com o de outros carotenoides descritos na literatura mostra que este corante possui poder antioxidante semelhante aos carotenoides astaxantina e cantaxantina cujas estruturas químicas apresentam substituintes carboxílicos nas extremidades de suas cadeias carbônicas assim como é observado na bixina.

**Palavras-chave:** produtos naturais; urucum; bixina; caracterização espectroscópica; tratamento de superfície; poder antioxidante.

## ABSTRACT

Electrochemistry has been a valuable tool in the analysis and characterization of natural products. This is because most of the active components of these products have functional groups capable of undergoing oxidation or electrochemical reduction processes. Annatto (*Bixa orellana L.*) is a compound widely used by the food industry as a natural dye and its main pigment is the carotenoid bixin. Spectroscopic characterization of annatto seeds and extracts confirmed the presence of bixin as the main component. The electrochemical activity of annatto was evaluated in an aqueous medium through the evaporation of its extracts (drop-casting) on the surface of different electrodes. Three electroactive species were detected and the electrochemical behavior of these substances proved to be sensitive to the working electrode used and the type of treatment given to its surface. The electrochemical oxidation of bixin was identified between 0.7 and 1.2 V. This oxidation occurs irreversibly and is affected by mass transport of protons in solution when surface extracts are evaluated at low scanning speeds. Bixin oxidation showed transfer coefficients between 0.72 and 0.86 depending on the extract or working electrode used, indicating that the extract oxidation mechanism occurs similarly on all surfaces. The evaluation of oxidized films of annatto extract on gold surface by Raman spectroscopy indicates that the electrochemical oxidation of bixin promotes changes in the unsaturation of its carbonic chain and involves the participation of the ester substituent present at one of its ends, suggesting that the process of oxidation converts bixin to norbixin. Comparison of the electrochemical index of bixin with that of other carotenoids described in the literature shows that this dye has antioxidant power similar to the carotenoids astaxanthin and canthaxanthin whose chemical structures have carboxylic substituents at the ends of their carbon chains, as observed in bixin.

**Keywords:** natural products; annatto; bixin; spectroscopic characterization; surface treatment; antioxidant power.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Características botânicas do urucum: a) árvore, b) frutos. ....	<b>22</b>
<b>Figura 2 -</b>	Carotenoides majoritários nas sementes de urucum: a) bixina e b) norbixina .....	<b>24</b>
<b>Figura 3 -</b>	Estrutura química do geranilgeraniol .....	<b>25</b>
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura química de um flavonoide.....	<b>26</b>
<b>Figura 5 -</b>	Estrutura química da apeginina. ....	<b>26</b>
<b>Figura 6 -</b>	Outros compostos encontrados no urucum: a) ácido gálico e b) pirofosfato de fernesilo. ....	<b>27</b>
<b>Figura 7 -</b>	Esquema da configuração de uma célula eletroquímica.....	<b>31</b>
<b>Figura 8 -</b>	Sinal de excitação em uma voltametria cíclica.....	<b>33</b>
<b>Figura 9 -</b>	Voltametria de pulso diferencial: a) sinal de excitação e b) sinal observado no voltamograma.....	<b>36</b>
<b>Figura 10 -</b>	Procedimento de fabricação do eletrodo de referência de Ag/AgCl em KCl (sat).....	<b>50</b>
<b>Figura 11-</b>	Esquema de deposição dos extratos na superfície dos eletrodos de trabalho. ....	<b>54</b>
<b>Figura 12 -</b>	Espectros de infravermelho das sementes de urucum: a) FTIR em KBr e b) FTIR ATR.....	<b>56</b>
<b>Figura 13 -</b>	Grau de maturação de sementes de urucum (SU); lote 1 (L1): a) armazenadas em estoque desde 2016, lote 2 (L2) recebido em 2020: b) velhas (L2V) , c) intermediárias (L2I), c) novas (L2N);.....	<b>58</b>
<b>Figura 14 -</b>	Espectros de infravermelho das sementes de urucum: a) FTIR-KBr e b) FTIR-ATR. ....	<b>59</b>
<b>Figura 15 -</b>	Espectros de IV-KBr de extratos de urucum extraídos em etanol (EtOH) e acetonitrila (MeCN). ....	<b>60</b>
<b>Figura 16 -</b>	Espectro Raman do filme do extrato de urucum em lâmina de vidro. ..	<b>61</b>

<b>Figura 17 -</b>	Espectros de UV-Vis dos extratos de urucum. ....	<b>63</b>
<b>Figura 18 -</b>	Voltamograma da superfície de Au em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M (branco) a 50 mV. s <sup>-1</sup> e T = 25°C .....	<b>64</b>
<b>Figura 19 -</b>	Cargas do eletrodo de ouro em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M a 50 mV.s <sup>-1</sup> : a) área de integração e b) variação das cargas com o tratamento de superfície. ....	<b>66</b>
<b>Figura 20 -</b>	Voltamograma do ECV em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M a 50 mV. s <sup>-1</sup> e T= 25°C.....	<b>68</b>
<b>Figura 21 -</b>	Tratamento de superfície ECV: a) alteração no voltamograma e b) variação das capacitâncias: tratamento original (T.O), tratamento de ativação (T.A), retorno ao tratamento original (R.T.O).....	<b>69</b>
<b>Figura 22 -</b>	Voltamogramas do [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 1mM em KCl 0,1M em eletrodos de pasta de carbono em diferentes proporções (m/m) de grafite e óleo mineral. v = 50 mV.s <sup>-1</sup> e T = 25 °C.....	<b>71</b>
<b>Figura 23 -</b>	Voltamogramas dos filmes depositados (10 µL) de: a) etanol puro (1° ciclo), b) extrato em EtOH antes da alteração da superfície (P1), c) extrato em EtOH depois da alteração da superfície (P2) e d) perfil do extrato (P2) com a janela de potencial ajustada. Superfície de ouro em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 50 mV.s <sup>-1</sup> a 50 mV.s <sup>-1</sup> e T = 25 °C.....	<b>73</b>
<b>Figura 24 -</b>	Voltamogramas dos filmes em superfície de ouro em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M a 50 mV/s: a) 10 µL de acetonitrila puro (1° ciclo) e b) 10 µL de extrato em acetonitrila.....	<b>75</b>
<b>Figura 25 -</b>	Efeito da velocidade de varredura no voltamograma e na corrente de oxidação do filme do extrato (10 µL) na superfície do eletrodo de ouro em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M (1°Ciclo): (a) e (c) em EtOH e (b) e (d) em MeCN (b) e (d). ....	<b>77</b>
<b>Figura 26 -</b>	Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Au em Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M (pH = 7): a) branco e 10 µL de EtOH evaporado na superfície (1° ciclo), b) filme do extrato em EtOH (10µL), c) Comparação meio neutro e ácido (1° ciclo) e d) efeito da velocidade de varredura (1° ciclo).....	<b>80</b>

<b>Figura 27 -</b>	Voltamogramas do ECV em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M a 50 mV.s <sup>-1</sup> e T= 25 °C: a) 10 μL de EtOH puro (1° ciclo) e b) 10 μL de extrato em EtOH evaporados na superfície.....	<b>81</b>
<b>Figura 28 -</b>	Voltamogramas do ECV em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M a 50 mV.s <sup>-1</sup> após o retorno ao tratamento de superfície original (1° ciclo): a) branco e b) 10 μL do extrato em EtOH evaporado na superfície .....	<b>82</b>
<b>Figura 29 -</b>	Efeito da velocidade de varredura no voltamograma do filme do extrato (10μL): (a) em EtOH e (b) em MeCN .....	<b>82</b>
<b>Figura 30 -</b>	Efeito da variação pH no voltamograma do ECV a) do branco, b) filme de extrato em EtOH (10μL) , c) no potencial de oxidação. pH = 1 a 5 → H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH = 7 → Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , v = 50 mV.s <sup>-1</sup> e.....	<b>84</b>
<b>Figura 31 -</b>	Voltamograma do EPC em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M a 20 mV.s <sup>-1</sup> : a) evaporação de 5μL de EtOH puro e b) evaporação de 5μL do extrato em EtOH na superfície.....	<b>86</b>
<b>Figura 32 -</b>	Voltamograma dos sinais do extrato de urucum em EtOH (5 μL) no EPC em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M a 20 mV.s <sup>-1</sup> : a) oxidação 1 e b) oxidação 2 e c) redução 1.....	<b>87</b>
<b>Figura 33 -</b>	Efeito do intervalo de potencial (ΔE) e direção da varredura na observação do pico da espécie eletroativa Oxi-2: a) sentido anódico e b) sentido catódico no EPC com 5 μL de extrato de urucum em EtOH em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M a 20 mV.s <sup>-1</sup> (1° ciclo).....	<b>88</b>
<b>Figura 34 -</b>	Efeito da variação da concentração do extrato de urucum em EtOH no EPC em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M a 20 mV.s <sup>-1</sup> : a) nos voltamogramas e nas correntes b) oxidação (Oxi-1) c) de pico (Oxi-2) e d) de redução (Red-1). .....	<b>89</b>
<b>Figura 35 -</b>	Efeito da variação da velocidade de varredura: a) no voltamograma do extrato de urucum em EtOH (5 μL), nas correntes b) de oxidação (Oxi-1), c) de pico (Oxi-2) e d) nos potenciais de oxidação e redução no EPC em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M: .....	<b>91</b>

<b>Figura 36</b> - Efeito da variação da concentração do pH nos voltamogramas a) do EPC e b) de extrato de urucum em EtOH (5 $\mu$ L) em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 M a 20 mV.s <sup>-1</sup> :.....	<b>93</b>
<b>Figura 37</b> - Cinética eletroquímica dos filmes de extratos de urucum na superfície do eletrodo de Au em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M nas velocidades de varredura de 5 mV.s <sup>-1</sup> (preto), 10 mV.s <sup>-1</sup> (violeta), 20 mV.s <sup>-1</sup> (verde) e 50 mV.s <sup>-1</sup> (azul): a) Região de Tafel analisada e ajustes de Tafel dos extratos b) em EtOH e c) em MeCN.....	<b>95</b>
<b>Figura 38</b> - Regressão não linear da equação de transporte de massa (9) para os extratos de urucum na superfície de Au em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M: a) Região do voltamograma analisada e ajustes para as curvas dos extratos b) em EtOH e c) em MeCN.....	<b>99</b>
<b>Figura 39</b> - Esquema de transferência iônico-eletrônica em um sistema trifásico...	<b>101</b>
<b>Figura 40</b> - EPC com extrato de urucum (5 $\mu$ L) em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M a 20 mV.s <sup>-1</sup> : Sem exposição à luz (preto e vermelho) e com exposição a luz (azul e violeta). .....	<b>102</b>
<b>Figura 41</b> - Esquema da avaliação espectro-eletroquímica do extrato de urucum em EtOH. ....	<b>103</b>
<b>Figura 42</b> - Imagens da superfície do eletrodo de disco de Au: a) eletrodo limpo L100x, extrato de urucum em EtOH b) filme L100x c) filme oxidado L10x e d) filme oxidado L100x. ....	<b>104</b>
<b>Figura 43</b> - Comparação entre os espectros do filme do extrato de urucum em EtOH evaporados na superfície do vidro (lâmina de microscópio) e eletrodo de ouro. ....	<b>105</b>
<b>Figura 44</b> - Oxidação do filme do extrato de urucum em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M a 20 mV.s <sup>-1</sup> : a) voltamograma (1° e 5° ciclo) e b) comparação dos espectros Raman antes e depois da oxidação .....	<b>106</b>
<b>Figura 45</b> - Voltamograma de pulso diferencial do eletrodo de pasta de carbono com extrato de urucum em EtOH (5 $\mu$ L) em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M. Linha de base corrigida .....	<b>112</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Parâmetros de obtenção dos espectros Raman dos filmes de extrato de urucum .....	<b>48</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Parâmetros usados na voltametria cíclica para a avaliação dos extratos de urucum.....	<b>53</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Parâmetros usados na voltametria de pulso diferencial para a avaliação dos extratos de urucum. ....	<b>53</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Informações dos extratos depositados em cada eletrodo de trabalho.....	<b>54</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Variação das áreas reais ( $A_R$ ) e dos fatores de rugosidade ( $f_R$ ) do eletrodo de ouro com tempo. ....	<b>67</b>
<b>Tabela 6 -</b>	Variação do potencial de oxidação ( $E_{ox}$ ) dos extratos com a velocidade de varredura em eletrodo de Au.....	<b>78</b>
<b>Tabela 7 -</b>	Variação do potencial de oxidação ( $E_{ox}$ ) dos extratos com a velocidade de varredura em ECV.....	<b>83</b>
<b>Tabela 8 -</b>	Coeficientes de transferência e correntes de troca para os extratos de urucum em diferentes eletrodos. ....	<b>96</b>
<b>Tabela 9 -</b>	Parâmetros extraídos dos ajustes de regressão não linear para os extratos de urucum em diferentes eletrodos a baixa velocidade de varredura ( $5 \text{ mV.s}^{-1}$ ).....	<b>99</b>
<b>Tabela 10 -</b>	Comparação entre os potenciais de oxidação da bixina (Oxi-1) com outros carotenoides avaliados na literatura. ....	<b>113</b>
<b>Tabela 11 -</b>	Comparação entre o índice eletroquímico (IE) da bixina e o de outros carotenoides avaliados na literatura. ....	<b>115</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Área

A<sub>R</sub>- Área real

b – Inclinação de Tafel

C- Concentração

E – Potencial da célula eletroquímica

E<sup>0</sup> – Potencial padrão do eletrodo

E<sub>ox</sub> – Potencial de oxidação

E<sub>p</sub> – Potencial de pico

E<sub>pa</sub> – Potencial de pico anódico

E<sub>pc</sub> – Potencial de pico catódico

E<sub>red</sub>- Potencial de redução

E<sub>1/2</sub> – Potencial de meia onda

ΔE- Variação de potencial

ECV- Eletrodo de carbono vítreo

EPC- Eletrodo de pasta de carbono

f<sub>R</sub>- Fator de rugosidade

F – Constante de Faraday

i – Corrente

i<sub>0</sub>- Corrente de troca

I<sub>L</sub> – Corrente limite

IV – Infravermelho

IE- Índice eletroquímico

I<sub>ox</sub> – Corrente de oxidação

I<sub>p</sub> – Corrente de Pico

$I_{pa}$  – Corrente de pico anódico

$I_{pc}$  – Corrente de pico catódico

$n$  – Número de elétrons

$n_{\alpha}$ - Número de elétrons da etapa determinante de velocidade

Oxi – Substância oxidada

PIGE- Eletrodo de grafite impregnado com parafina

$R_{ed}$ - Substância reduzida

$Q$  - Carga

$Q_a$  - Carga anódica

$Q_c$  - Carga Catódica

$Q_{cm}$  - Carga catódica média

$R$  – Constante universal dos gases

$T$  – Temperatura

$t$ - Tempo

UV-Vis- Ultravioleta-Visível

VC- Voltametria Cíclica

VPD- Voltametria de pulso diferencial

VOQ- Voltametria de onda quadrada

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  – Coeficiente de transferência

$\Delta$  – Variação

e – Elétron

$v$  – Velocidade de varredura

$\eta$  – Sobretensão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>O urucum</b> .....	21
<b>2.1.1</b>	<i>Aspectos históricos e aplicações</i> .....	21
<b>2.1.2</b>	<i>Características botânicas</i> .....	22
<b>2.1.3</b>	<i>Composição química das sementes de urucum</i> .....	23
<b>2.1.3.1</b>	<i>Carotenoides</i> .....	23
<b>2.1.3.2</b>	<i>Terpenos</i> .....	24
<b>2.1.3.3</b>	<i>Compostos fenólicos</i> .....	25
<b>2.1.3.4</b>	<i>Outros compostos</i> .....	26
<b>2.1.4</b>	<i>Extração dos pigmentos do urucum</i> .....	27
<b>2.1.4.1</b>	<i>Extração em óleo vegetal</i> .....	27
<b>2.1.4.2</b>	<i>Extração em Solventes apolares</i> .....	28
<b>2.1.4.3</b>	<i>Extração básica</i> .....	28
<b>2.1.4.4</b>	<i>Extração alcoólica</i> .....	29
<b>2.1.5</b>	<i>Estabilidade dos pigmentos de urucum</i> .....	29
<b>2.1.6</b>	<i>Toxicologia</i> .....	29
<b>2.2</b>	<b>Fundamentos da eletroquímica</b> .....	30
<b>2.2.1</b>	<i>A célula eletroquímica</i> .....	30
<b>2.2.2</b>	<i>O eletrodo de trabalho</i> .....	31
<b>2.2.2.1</b>	<i>Tratamento de superfície</i> .....	31
<b>2.2.3</b>	<i>Voltametria</i> .....	32
<b>2.2.3.1</b>	<i>Voltametria cíclica</i> .....	33
<b>2.2.3.2</b>	<i>Voltametria de pulso diferencial</i> .....	35
<b>2.3</b>	<b>Compostos naturais</b> .....	37
<b>2.3.1</b>	<i>Análise eletroquímica de compostos naturais</i> .....	38

2.3.1.1	<i>Caracterização eletroquímica de carotenoides</i>	40
2.3.1.1.1	Caracterização em meio orgânico	41
2.3.1.1.2	Caracterização em meio aquoso	43
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	45
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	45
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	45
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	46
<b>4.1</b>	<b>Compostos químicos</b>	46
<b>4.2</b>	<b>Materiais, equipamentos e software's</b>	46
<b>4.3</b>	<b>Procedimento Experimental</b>	46
<b>4.3.1</b>	<i>Tratamento das sementes e obtenção do extrato</i>	46
<b>4.3.2</b>	<i>Caracterização espectroscópica</i>	47
4.3.2.1	<i>Espectroscopia no infravermelho</i>	47
4.3.1.2	<i>Espectroscopia UV-Vis</i>	47
4.3.1.3	<i>Espectroscopia Raman</i>	48
<b>4.3.3</b>	<i>Medidas eletroquímicas</i>	48
4.3.3.1	<i>Célula eletroquímica</i>	48
4.3.3.2	<i>Fabricação do eletrodo de referência</i>	49
4.3.3.3	<i>Tratamento da superfície do eletrodo de trabalho</i>	50
4.3.3.3.1	Eletrodo de carbono vítreo (ECV)	50
4.3.3.3.2	Eletrodo policristalino de ouro	51
4.3.3.3.3	Eletrodo de disco de ouro	51
4.3.3.3.4	Eletrodo de pasta de carbono (EPC)	52
4.3.3.4	<i>Técnicas eletroquímicas</i>	53
<b>4.3.4</b>	<i>Avaliação do extrato</i>	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	56
<b>5.1</b>	<b>Caracterização espectroscópica do urucum</b>	56
<b>5.1.1</b>	<i>Sementes</i>	56
5.1.1.1	<i>Espectroscopia no infravermelho</i>	56

<b>5.1.2</b>	<b><i>Extrato</i></b> .....	60
5.1.2.1	<i>Espectroscopia no infravermelho</i> .....	60
5.1.2.2	<i>Espectroscopia Raman</i> .....	61
5.1.2.3	<i>Espectroscopia no UV-Vis</i> .....	62
<b>5.2</b>	<b><i>Eletroquímica</i></b> .....	64
<b>5.2.1</b>	<b><i>Tratamento de superfície</i></b> .....	64
5.2.1.1	<i>Eletrodo de ouro</i> .....	64
5.2.1.2	<i>Eletrodo de carbono vítreo (ECV)</i> .....	67
5.2.1.3	<i>Eletrodo de pasta de carbono (EPC)</i> .....	70
<b>5.3</b>	<b><i>Avaliação eletroquímica do urucum</i></b> .....	72
<b>5.3.1</b>	<b><i>Eletrodo de ouro</i></b> .....	72
5.3.1.1	<i>Variação da velocidade de varredura</i> .....	76
5.3.1.2	<i>Variação do eletrólito</i> .....	79
<b>5.3.2</b>	<b><i>Eletrodo de carbono vítreo (ECV)</i></b> .....	80
5.3.2.1	<i>Efeito da velocidade de varredura</i> .....	82
5.3.2.2	<i>Efeito do pH</i> .....	83
<b>5.3.3</b>	<b><i>Eletrodo de pasta de carbono (EPC)</i></b> .....	85
5.3.3.1	<i>Efeito da concentração</i> .....	89
5.3.3.2	<i>Efeito da velocidade de varredura</i> .....	90
5.3.3.3	<i>Efeito do pH</i> .....	92
<b>5.3.4</b>	<b><i>Cinética eletroquímica</i></b> .....	94
<b>5.4</b>	<b><i>Avaliações complementares</i></b> .....	101
<b>5.4.1</b>	<b><i>Interação do extrato com a luz</i></b> .....	102
<b>5.4.2</b>	<b><i>Caracterização espectro-eletroquímica</i></b> .....	103
<b>5.5</b>	<b><i>Identificação das substâncias eletroativas</i></b> .....	106
<b>5.5.1</b>	<b><i>Substância eletroativa Oxi-1</i></b> .....	107
<b>5.5.2</b>	<b><i>Substância eletroativa Oxi-2</i></b> .....	107
<b>5.5.3</b>	<b><i>Substância eletroativa Red-1</i></b> .....	108
<b>5.6</b>	<b><i>Considerações sobre o mecanismo de oxidação da bixina</i></b> .....	109

<b>5.7</b>	<b>Determinação do poder antioxidante do extrato de urucum .....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A química de compostos naturais é amplamente investigada na literatura com as mais variadas finalidades. Isso porque, tais compostos possuem uma vasta área de aplicação que vai desde a farmacêutica na produção de xaropes, cosmética na fabricação de bronzeadores, alimentícia como corante natural até a construção civil através de estudos que avaliam o desempenho de compostos naturais como inibidores de corrosão (SCOTTER, 2009; FELIPE & BICAS, 2017; CABRAL, 2018).

Dentre as varias propriedades exibidas por esses compostos, a sua ação antioxidante tem chamado a atenção, uma vez que tal propriedade costuma ser associada a efeitos terapêuticos (SKALTSOUNIS, et.al, 2013). As características antioxidantes exibidas por compostos naturais estão associadas a sua estrutura molecular, composta de grupos funcionais e ligações insaturadas facilmente oxidáveis.

Na literatura, técnicas espectrofotométricas, fluorométricas, termogravimétricas e de luminescência são classicamente utilizadas para avaliar a oxidação de compostos naturais (GŁÓD, et.al, 2012). No entanto, a alta disposição em perder elétrons faz com que a eletroquímica seja uma ferramenta extremamente útil na avaliação da oxidação dessas espécies.

De fato, a eletroquímica tem sido amplamente utilizada na análise e caracterização de compostos naturais sejam eles puros ou em sua forma bruta (MACÊDO, et al., 2017; PEIXOTO, et al., 2017). Ultrapassando a avaliação de suas propriedades antioxidantes, a eletroquímica admite realizar uma caracterização mais robusta dos compostos naturais através da identificação de espécies eletroativas, permitindo propor mecanismos de oxidação e obter informações cinéticas específicas que até então não era possível com as técnicas tradicionais.

Neste trabalho, extratos de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*) foram caracterizados eletroquimicamente em diferentes superfícies e em meio aquoso. O comportamento eletroquímico e as informações espectroscópicas foram utilizados para avaliar as substâncias eletroativas, obter informações cinéticas de seus processos de oxidação além de comparar seu poder antioxidante com outros carotenoides estudados na literatura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O urucum

#### 2.1.1 Aspectos históricos e aplicações

A *Bixa orellana* é uma planta originária das áreas tropicais da América Latina, Índia e África. Por causa de sua ampla distribuição geográfica seu fruto apresenta vários nomes populares ao redor do mundo. É conhecido por annatto na Inglaterra, Itália e Estados Unidos. Na Espanha é popularmente conhecido por bija. Na França seu nome é roucouyere. Na América espanhola a planta pode ser chamada pelos nomes achiote, anoto, onotillo, roekoe, cacicuto, uruca entre outros (VERISSÍMO, 2003).

No Brasil, a planta é chamada de urucuzeiro e seu fruto tem como principal nome o urucum. Esse nome tem origem indígena na palavra “uru-ku” que significa vermelho em tupi-gurani. No entanto, em diversas regiões do país pode ser chamado pelos nomes colorau, açafroa, bixa, urucu, urucu-uva, urucu-bravo, além de também ser conhecido por outros nomes indígenas ahitê, nukirê, bixe e bichá na região norte do país (VERISSÍMO, 2003; SANTOS, 2013).

Os primeiros registros históricos do uso das sementes de urucum são datados de 1500, na carta de Pero Vaz de Caminha para o rei de Portugal sobre os achados e primeiras impressões da terra recém “descoberta” (SANTOS, 2013):

“...uns ouriços verdes, de árvores que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais e mais pequenos, e eram cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagados entre os dedos, faziam tintura vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam...”

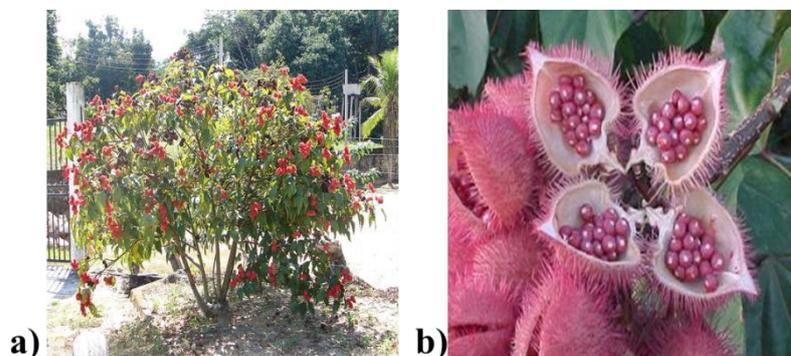
Historicamente, o urucum era utilizado pelos índios como fonte de matéria-prima de tinturas. Seu corante vermelho era utilizado para os mais variados fins, desde a decoração de cerâmicas a pinturas corporais para rituais, proteção contra picadas de insetos e como protetor solar (CONSTANT, et al., 2002). Atualmente, as sementes são usadas pela indústria alimentícia, farmacológica e cosmética. Na indústria alimentícia é amplamente usado como

corante natural com o extrato de suas sementes sendo o principal componente do corante comercial (SCOTTER, M., 2009), além de também ser utilizado como antioxidante na preservação de produtos cárneos (GARCIA et. al., 2012). Na medicina, o urucum é utilizado no tratamento de afecções no coração, para doenças como a tuberculose e para males do fígado. Suas propriedades expectorantes, antipiréticas e anti-inflamatórias são bastante usadas no tratamento de problemas de pele e na fabricação de xaropes (LIMA, et al., 2006). Na indústria de cosmético os corantes de urucum são utilizados na fabricação de pó facial, batons, loções, bronzeadores e cremes (LIMA, 2005). Há ainda estudos que avaliam o desempenho de extratos de urucum na fabricação de filmes biodegradáveis (SILVEIRA, T., 2017) e como inibidor da corrosão do aço carbono (CABRAL, 2018).

### 2.1.2 Características botânicas

O urucum (*Bixa orellana*) faz parte da família Bixaceae de gênero *Bixa* cuja espécie mais cultivada é a *Bixa orellana* L. Sua árvore, o urucuzeiro (fig. 1-a), possui em média 6 metros de altura com diâmetro de caule entre 15 e 20 centímetros. Os frutos (fig. 1-b) apresentam-se em cápsulas de formato ovoides, hemisféricas elipsoides ou cônicas e coloração que vai desde o castanho escuro ou avermelhado até o amarelo pálido dependendo da espécie avaliada. A parte exterior é amplamente coberta por espinhos flexíveis e as cápsulas se abrem em duas partes iguais cujos centros contêm numerosas sementes rodeadas de uma polpa vermelha (SANTOS, 2013).

**Figura 1 - Características botânicas do urucum: a) árvore, b) frutos.**



Fonte: Franco et al., (2008).

### 2.1.3 Composição química das sementes de urucum

Os estudos realizados na tentativa de caracterizar os compostos presentes nas sementes de urucum mostram que as mesmas contêm várias classes de substâncias das quais se destacam os carotenoides, terpenos, flavonoides e tocoferóis.

#### 2.1.3.1 Carotenoides

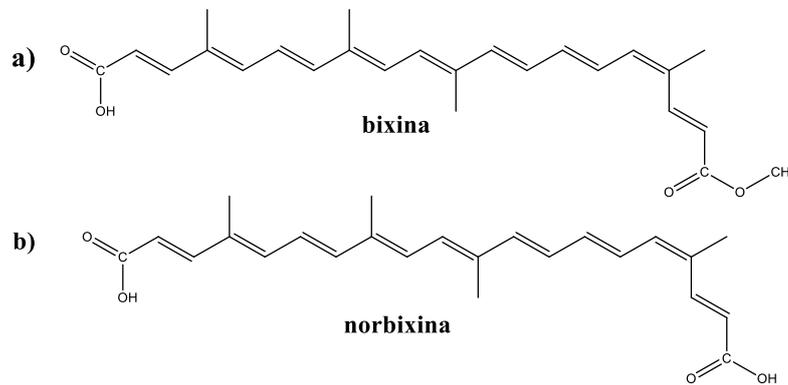
Os carotenoides compõem uma classe de pigmentos naturais que possui cerca de 700 representantes e apresenta coloração intensa que vai desde o amarelo passando pela laranja até o vermelho. Essas substâncias ocorrem naturalmente nos seres vivos, principalmente nos de origem vegetal e são caracterizadas pela presença de longas cadeias carbônicas conjugadas organizadas em estruturas com tamanhos de aproximadamente quarenta átomos de carbono ( $C_{40}$ ), (MESQUITA et al., 2017). A presença de ligações múltiplas conjugadas faz com que os carotenoides oxidem facilmente e percam sua coloração característica. A resistência dessas substâncias frente à oxidação depende fortemente do ambiente ao qual estão expostas (SANTOS, 2013). Dentre os carotenoides presentes no urucum a bixina e a norbixina destacam-se por serem encontradas em maior quantidade e estarem intimamente relacionadas com a coloração das sementes.

A bixina (fig. 2-a) pertence à classe dos apocarotenóides (derivados da clivagem oxidativa de carotenos, apresentam cadeias carbônicas de tamanho médio  $C_{25}$ ) é uma substância lipossolúvel de coloração vermelha. A bixina apresenta uma cadeia carbônica com 25 átomos de carbonos conjugados com um grupo éster em uma extremidade da cadeia e um grupo ácido na outra. Esta substância pode apresentar-se nas formas *cis* e *trans* sendo esta a mais estável (isobixina) e geralmente obtida em processos de extração que utilizam aquecimento. A bixina representa cerca de 80% dos carotenoides totais das sementes de urucum, obtida em grande quantidade no pericarpo das sementes é a responsável pela coloração característica das mesmas (MERCADANTE & PFANDER, 2001; PRESTO & RICKARD, 1980).

A Norbixina (fig. 2-b) é o segundo carotenoide em maior quantidade nas sementes de urucum. Ela é hidrossolúvel e apresenta coloração amarela quando extraída. A estrutura da

norbixina consiste em uma cadeia carbônica semelhante à da bixina ( $C_{25}$ ) com um grupo ácido em cada extremidade da molécula. A norbixina também pode ser obtida através da bixina quando esta é submetida a uma reação de saponificação, seguida de precipitação ácida (SANTOS, 2013). Suas propriedades hidrofílicas tornam a norbixina preferível na produção de alguns produtos comerciais como iogurtes, cervejas e refrigerantes (PIRES, 2018).

**Figura 2 - Carotenoides majoritários nas sementes de urucum: a) bixina e b) norbixina**



Fonte: A autora (2023).

Outros carotenoides em menores quantidades foram isolados nas sementes de urucum por Mercadante e colaboradores através de técnicas como espectrometria de massas e RMN (MERCADANTE et al., 1995;1997;1999). A partir desses estudos foi possível dividir esses carotenoides minoritários em três grupos: a- os ésteres metílicos e apocarotenoides (compostos com cadeias carbônicas com  $C_{30}$  ou  $C_{32}$ ); b- diapocarotenóides com grupos terminais: éster metílico, cetona ou aldeído ( $C_{19}$ ,  $C_{22}$ ,  $C_{24}$  e  $C_{25}$ ) e c- ácidos de diapocarotenóides ( $C_{22}$  e  $C_{24}$ ) esterificados com grupos metil e geranilgeraniol (MERCADANTE & PFANDER, 2001).

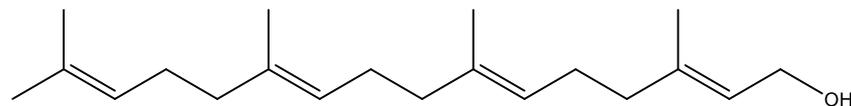
### 2.1.3.2 Terpenos

Os terpenos, conhecidos como “alcenos naturais” apresentam estruturas que se dividem em blocos de cinco carbonos (unidades de isopreno,  $C_5H_8$ ) geralmente ligados entre si em uma ordem cabeça-calda (ligação-1,4). Os terpenos que apresentam ligações com átomo

de oxigênio são chamados terpenoides e apresentam várias funções químicas como álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos, fenóis e epóxidos. O conjunto de vários terpenos ligados entre si formam o que é chamado de óleo essencial. Os óleos essenciais são utilizados pela indústria de cosméticos, na fabricação de perfumes além de ser utilizado também pela indústria alimentícia devido a sua contribuição na qualidade sensorial de alimentos (BICAS & FELIPE, 2016).

O geranilgeraniol (fig. 3) conhecido como óleo essencial do urucum é encontrado no pericarpo das sementes e corresponde a cerca de 1% da massa das sementes secas. Esse terpenoide é um importante intermediário de síntese de tocoferóis, tocotrienóis, da vitamina K, de diversos hormônios e carotenoides (DESMCZUK Jr & RIBANI, 2015; COSTA & CHAVEZ, 2005).

**Figura 3 - Estrutura química do geranilgeraniol**

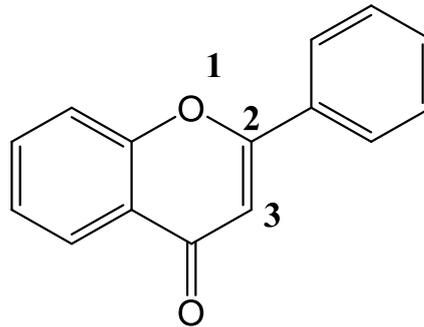


Fonte: A autora (2023).

### 2.1.3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são divididos em diversas classes onde as mais conhecidas são os ácidos fenólicos, flavonoides e os taninos. Os flavonoides (fig. 4) representam a maior parte dos compostos fenólicos e sua estrutura é caracterizada por apresentar dois anéis benzênicos ligados por um anel pirano. São encontrados na maioria dos vegetais em suas cascas, flores, frutos e folhas, em alguns casos podem ser responsáveis pela cor e/ou sabor das plantas (MARTINS DE SÁ, 2013).

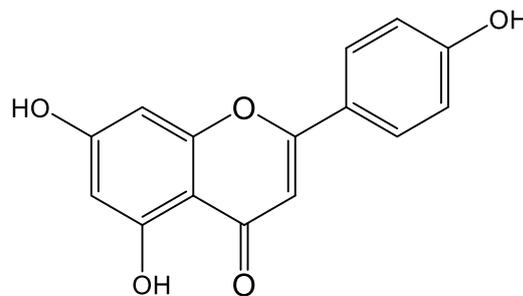
**Figura 4 - Estrutura química de um flavonoide.**



Fonte: A autora (2023).

Os flavonoides apresentam propriedades antibacterianas, antivirais, antialérgicas, anti-inflamatória, anestésica entre outras. No urucum, o flavonoide encontrado em maior quantidade é a apeginina (fig. 5) apresentando-se nas formas 7-glicosil-apigenina e 7-bissulfato-apigenina; há ainda outros flavonoides detectados em menores quantidades como o 7-glicosil luteolina e o 7-bissulfato luteolina (LEMOS, 2008).

**Figura 5 - Estrutura química da apeginina.**

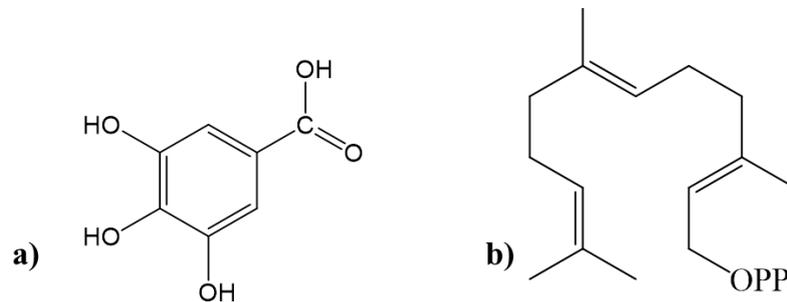


Fonte: A autora (2023).

#### 2.1.3.4 Outros compostos

Nas sementes de urucum ainda são detectados outros compostos como os ácidos gálico (fig.6-a) e alfitólico, açúcares, celulose, proteínas, gorduras, cálcio, ferro e fósforo. Além de traços pirofosfato de farnesilo (fig. 6-b) e de acetato de occidentalol (SANTOS, 2013).

**Figura 6 - Outros compostos encontrados no urucum: a) ácido gálico e b) pirofosfato de fernesilo.**



Fonte: A autora (2023).

#### **2.1.4 Extração dos pigmentos do urucum**

Os pigmentos do urucum são extraídos do pericarpo das sementes e podem apresentar características lipossolúveis ou hidrossolúveis. A composição principal do extrato depende da forma de extração ou solvente utilizado. Na literatura, os principais métodos para a extração do urucum são:

##### **2.1.4.1 Extração em óleo vegetal**

A bixina é o principal componente obtido através da extração das sementes de urucum utilizando solventes apolares como o óleo vegetal. O extrato obtido dessa forma pode ser utilizado ou comercializado diretamente nesse meio (SILVA, 2007).

A extração em óleo vegetal é comumente feita a frio com as sementes esmagadas em contato com o óleo vegetal sob agitação. Esse tipo de extração consegue transferir grande parte do pigmento do pericarpo das sementes e costuma ter a coloração avermelhada do seu principal corante, a bixina em conformação cis. Alternativamente, a mistura de sementes e óleo vegetal poder ser aquecida, em temperaturas inferiores a 70 °C. Esse extrato pode ser tratado sob vácuo em temperaturas que não excedam 130 °C que após filtração de materiais insolúveis produz uma pasta com mistura dos isômeros de bixina e produtos de degradação térmica de coloração amarela (PRESTO & RICKARD, 1980).

#### 2.1.4.2 *Extração em Solventes apolares*

Solventes como hexano e clorofórmio podem ser utilizados para extração de compostos apolares presentes nas sementes de urucum. Neste caso, extrações das sementes pulverizadas são feitas com agitação a frio. Um extrato em forma de pasta ou filme é obtido após a evaporação do solvente e apresentam teores de bixina superiores a 80% (PRESTO & RICKARD, 1980).

Uma das limitações da extração com solventes orgânicos ou óleo vegetal é que o extrato final deve ter compatibilidade com a sua finalidade, uma vez que sua solubilidade em outros meios é reduzida. Além disso, a toxicidade do solvente deve ser levada em consideração caso o extrato seja utilizado para fins alimentícios (PIMENTEL & STRINGHETA, 1999).

#### 2.1.4.3 *Extração básica*

A extração básica é utilizada quando o objetivo final é obter extratos hidrossolúveis de urucum. Os principais álcalis utilizados nesse tipo de extração são os hidróxidos de sódio, potássio ou amônio e o carbonato de cálcio (PIMENTEL & STRINGHETA, 1999). O processo utilizado é a saponificação onde a bixina é desprotonada e convertida em um sal, geralmente de sódio ou potássio solúvel em água. Além da obtenção de extratos de urucum hidrossolúveis, a saponificação também é usada como meio para converter a bixina em norbixina através da precipitação ácida (SILVA, 2007).

O processo de saponificação com conversão significativa de bixina em norbixina depende em maior extensão da concentração e natureza do álcali utilizado. Silva e colaboradores (2007;2009) observaram que a reação de saponificação ocorre para valores de pH superiores a 10 e que a conversão de bixina para norbixina é facilitada com o aumento da temperatura de extração.

#### *2.1.4.4 Extração alcoólica*

A extração dos pigmentos das sementes com solventes alcoólicos é muito utilizada pela indústria processadora de urucum. O etanol é o álcool mais usado, pois sua alta produção no país diminuiu os gastos com solvente. Além disso, apresenta menor ponto de ebulição e toxicidade o que diminui os custos com manuseio e descarte de rejeitos (SILVA, 2007).

A extração em meio alcoólico geralmente é realizada a frio e sob agitação constante. A solução contendo o extrato geralmente apresenta coloração intensa e aspecto límpido. Com a remoção do solvente, um filme de coloração avermelhada é observado. Esse tipo de extração produz extratos com um teor de bixina que pode chegar a cerca de 70% (SILVA, 2007).

#### *2.1.5 Estabilidade dos pigmentos de urucum*

Embora os corantes naturais sejam preferíveis em comparação aos sintéticos devido a sua baixa toxicidade, são menos estáveis e, por isso, mais suscetíveis à degradação e perda de coloração.

No caso da bixina, a perda de sua coloração característica ocorre quando o extrato é exposto à luz por um longo período de tempo. Isso ocorre através de um processo chamado foto-oxidação onde as moléculas do corante absorvem luz e ficam muito tempo em um estado excitado, interagindo com o O<sub>2</sub> e produzindo radicais livres que posteriormente as degradam. Essa degradação pode ser minimizada protegendo os extratos da luz e/ou adicionando a eles antioxidantes como o palmitato de ascobila (DIAS, 2010; NAJAR et al., 1998).

#### *2.1.6 Toxicologia*

A toxicologia das sementes de urucum foi avaliada em alguns estudos e mostrou que as mesmas não apresentam efeitos tóxicos ou insalubres às células renais, hepáticas ou sobre a medula óssea de camundongos. Pesquisas também apontam que os corantes do urucum não apresentam efeitos tóxicos aos seres humanos. No entanto, foi relatado que o urucum apresenta efeito sobre o controle metabólico da glicose dos camundongos; além disso, traços

de carotenoides (bixina e compostos semelhantes) podem ser encontrados no sangue humano poucas horas após sua ingestão (COSTA & CHAVEZ, 2005; VERISSÍMO, 2003).

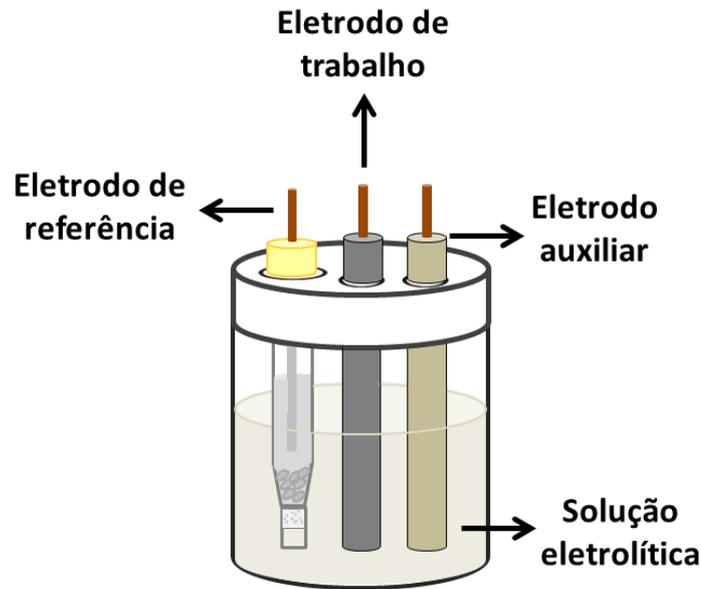
## **2.2 Fundamentos da eletroquímica**

A eletroquímica estuda os fenômenos associados à separação de cargas. Essa separação provoca uma transferência de carga que pode ocorrer na solução (transferência homogênea) ou na superfície do eletrodo (transferência heterogênea). As reações de transferência de carga ocorrem em eletrodos diferentes (à exceção das transferências homogêneas) imersos em solução em uma célula eletroquímica (BRET & BRET, 1996). Nas reações eletroquímicas uma substância é oxidada enquanto outra é reduzida, e, é a esse processo que está associado à transferência de carga/corrente elétrica. A região na qual ocorre a oxidação é chamada de anodo enquanto a região na qual ocorre a redução é chamada de catodo. Reações desse tipo são chamadas reações de oxirredução (RAYMUNDO, 2007).

### **2.2.1 A célula eletroquímica**

A célula eletroquímica (fig. 7) é o compartimento no qual ocorrem as reações eletroquímicas e é composta de um eletrólito suporte e de eletrodos. Esses eletrodos são ligados por materiais condutores tanto pela solução, através da condução iônica, quanto externamente por fios e contatos elétricos que possibilitam o transporte de carga. Dependendo da configuração da célula os produtos das reações de oxidação/redução podem ser separados. Se a energia livre resultante das reações é negativa a energia elétrica pode ser armazenada (baterias); além disso, é possível também fornecer uma energia elétrica externa a um determinado sistema para forçar a ocorrência de reações químicas que não ocorrem naturalmente através de um processo conhecido por eletrólise (BRET & BRET, 1993). A configuração de uma célula eletroquímica admite arranjos de dois ou três eletrodos, sendo esta a mais comum e composta por um eletrodo auxiliar, um eletrodo de referência e um eletrodo de trabalho.

Figura 7 - Esquema da configuração de uma célula eletroquímica.



Fonte: A autora (2023).

### 2.2.2 O eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho é o eletrodo no qual ocorre a reação de interesse. Ele possui uma área relativamente pequena e fornece informações sobre o analito através da magnitude da corrente que flui entre ele e o eletrodo auxiliar ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência. Os eletrodos de trabalho são feitos dos mais variados materiais com os de carbono (grafite ou vítreo) sendo os mais utilizados. Eles também podem ser metálicos para estudos de corrosão ou de metais nobres como ouro e platina (BRET & BRET, 1993; PACHECO et al. 2013).

#### 2.2.2.1 Tratamento de superfície

A realização de procedimentos experimentais que forneçam resultados com a mínima ação de interferentes, e, com isso, mais reprodutíveis é um dos principais objetivos em estudos eletroquímicos. O sucesso nessa busca requer protocolos que visam o cuidado em todas as etapas do processo que vão desde o planejamento das espécies químicas a serem utilizadas passando pela limpeza dos materiais e calibração dos equipamentos. Nesse quesito,

o tratamento dado à superfície do eletrodo de trabalho se destaca, pois tem relação direta com a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos (GOLDSTEIN & VAN DE MARK, 1982; HU, KARWEIK, & KUWANA, 1985).

O tratamento da superfície geralmente é realizado através de técnicas de limpeza e ativação. Dependendo do eletrodo de trabalho, os resultados podem ser tornar mais reprodutíveis (e com isso mais confiáveis) ou tornar um eletrodo mais sensível a uma espécie com quem antes não possuía uma interação significativa (HU, KARWEIK, & KUWANA, 1985).

Técnicas de alto-polimento, pré-tratamento químico ou eletroquímico, oxidação, modificação de superfícies e dispersão de óxidos podem ser empregadas (a depender do eletrodo) para aumentar a atividade, sensibilidade e reprodutibilidade dos experimentos para que os resultados atendam os padrões analíticos desejados (HU, KARWEIK, & KUWANA, 1985; ZAK & KUWANA, 1982; 1983).

A ativação de superfície melhora sua capacidade de promover a oxidação/redução de substâncias. A extensão dessa melhora pode ser quantificada através da análise dos parâmetros cinéticos das reações de interesse e geralmente está associada à remoção de contaminantes, aumento de área superficial e/ou adição de grupos funcionais que podem atuar como mediadores de transferência de elétrons catalisando a reação de oxirredução em estudo (MAJIDI, JABBARI, HARI, & MOOSAVI-MOVAHEDI, 2007).

Assim, várias técnicas podem ser utilizadas para avaliar de forma qualitativa e quantitativa, a influência do tratamento de superfície na cinética de reação das mais variadas espécies. No entanto, a escolha de um determinado método deve ser cautelosa, pois cada técnica pode alterar a superfície de alguma forma deixando subprodutos ou modificando sua área de uma forma indesejada, e, com isso, provocando distorções nos resultados que podem induzir o pesquisador a interpretações equivocadas (GOLDSTEIN & VAN DE MARK, 1982).

### **2.2.3 Voltametria**

A voltametria é uma técnica que se baseia em fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e uma fina camada de solução adjacente a essa

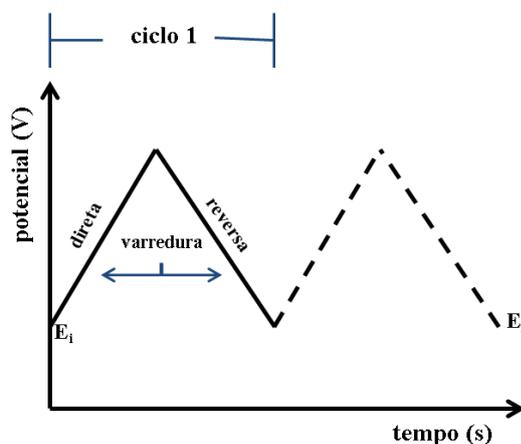
superfície. Essa técnica consiste na aplicação de um potencial (variante com o tempo) ao eletrodo de trabalho que promove a ocorrência de reações de oxidação ou redução de substâncias eletroativas próximas à interface. A magnitude da corrente elétrica observada como resultado dessas reações é o parâmetro utilizado para obter informações sobre o analito, uma vez que ela é diretamente proporcional à concentração da espécie na amostra (BRET & BRET, 1993; RAYMUNDO, 2007).

Ao aplicar uma diferença de potencial ( $\Delta E$ ) entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência mede-se a corrente elétrica ( $I$ ) que flui entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. O diagrama de corrente em função do potencial aplicado é chamado de voltamograma (RAYMUNDO, 2007).

### 2.2.3.1 Voltametria cíclica

Na voltametria cíclica (VC), a aplicação do potencial é iniciada em um valor em que não há a ocorrência de reações redox. Essa varredura é feita positivamente (varredura anódica) ou negativamente (varredura catódica) até um valor em que as reações de oxidação/redução das espécies eletroativas próximas ao eletrodo tenham ocorrido. Ao atingir esse potencial, a varredura tem seu sentido invertido e retorna ao valor inicial, completando um ciclo de análise, e, é por esse motivo, que a técnica é chamada de voltametria cíclica (EVANS et. al, 1983; MARKEN et. al, 2010).

**Figura 8 -** Sinal de excitação em uma voltametria cíclica.



**Fonte:** Adaptado de Kissinger & Heineman (1983).

Durante essa varredura, uma corrente elétrica é observada como resposta à diferença de potencial aplicada. Essa corrente apresenta contribuição de dois tipos de corrente: a corrente capacitiva resultante de uma variação de carga na dupla camada elétrica e a faradáica resultante da reação redox que ocorre no eletrodo de trabalho:

$$I = I_C + I_F = C_d \frac{dE}{dt} + I_F = vC_d + I_F \quad (1)$$

Onde  $C_d$  é capacitância da dupla camada e  $v$  é a velocidade de varredura. Assim, para experimentos em que altas velocidades de varredura são empregadas, a corrente capacitiva deve ser subtraída da corrente total para que as informações do analito sejam as mais exatas possíveis.

As informações sobre os analito presentes na interface eletrodo/solução são obtidas através da magnitude das correntes observadas nesse intervalo de potencial e no voltamograma, essas correntes aparecem como picos de oxidação e/ou redução. A intensidade desses picos é proporcional à quantidade de substância reagindo na superfície do eletrodo e a presença de dois ou mais picos de oxidação ou redução indica a formação e reação de espécies eletroativas intermediárias (SAITO & KIKUCHI, 2013).

Os parâmetros essenciais extraídos de uma voltametria cíclica são: corrente de pico ( $I_p$ ) a corrente máxima observada para um processo de redução ( $I_{pc}$ ) ou de oxidação ( $I_{pa}$ ), potencial de pico ( $E_p$ ) é o potencial no qual a corrente máxima é observada, e também, é denominada  $E_{pc}$  e  $E_{pa}$  pra os processos de redução e oxidação respectivamente. O valor no qual o potencial é metade do valor do potencial de pico é chamado de meio pico,  $E_{1/2}$  (MARKEN et al., 2010).

As espécies eletroativas podem reagir de forma reversível, parcialmente reversível ou irreversível e essas três formas podem ser distinguidas através de seus voltamogramas. No voltamograma de uma transformação que ocorre reversivelmente é possível observar picos de oxidação e redução de intensidades proporcionais indicando que as espécies que foram geradas durante a varredura anódica (oxidação) são completamente reduzidas durante a varredura catódica, essa e outras condições são utilizadas para avaliar a reversibilidade de uma reação (BRETT, A. & BRETT, C., 1996; MARKEN et al., 2010).

O voltamograma de uma reação irreversível se assemelha ao perfil observado para uma voltametria de varredura linear onde não é observada a presença de um pico inverso ao se realizar a varredura no sentido contrário. Nesse caso, as espécies eletroativas irão reagir uma única vez e formarão um produto eletroquimicamente inativo que será liberado para a solução ou ficará adsorvida na superfície do eletrodo de trabalho. A expressão para a corrente de pico depende da forma como as espécies eletroativas interagem cineticamente com a superfície. Para substâncias eletroativas confinadas na superfície do eletrodo, a corrente de pico é dada por (BARD & FAULKNER, 1980):

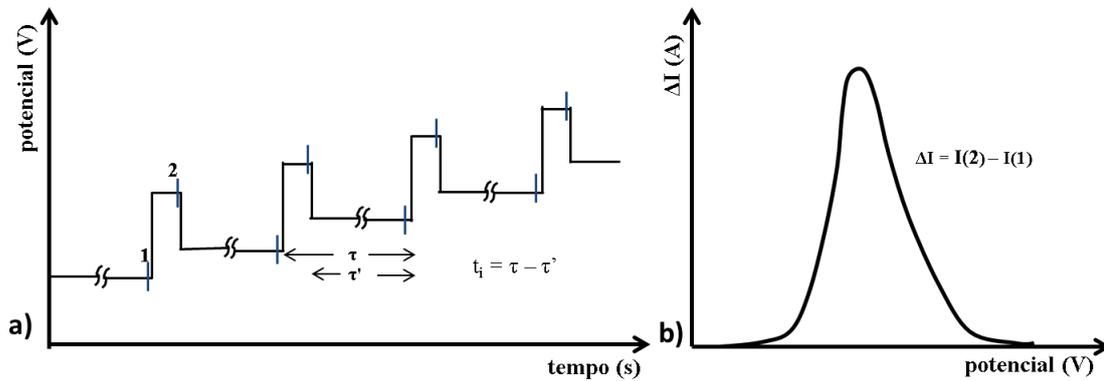
$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_O^* \quad (2)$$

Onde  $n$  é o número de elétrons,  $A$  é a área do eletrodo,  $F$ ,  $R$ ,  $T$  e  $v$  são as constantes de Faraday, dos gases, a temperatura e a velocidade de varredura, respectivamente. Como as moléculas da substância estão adsorvidas, o recobrimento delas na superfície do eletrodo é dado por  $\Gamma_O^*$  em  $\text{mol.cm}^{-2}$ .

### 2.2.3.2 Voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial (VPD), a perturbação do sistema é feita através da aplicação de pulsos crescentes de potencial cuja amplitude é fixa. Nesta técnica a corrente é medida em duas ocasiões: uma no início e outra no final de cada pulso aplicado. A corrente resultante é obtida através da diferença entre essas duas correntes e, no voltamograma, essa corrente total aparece como um pico em forma de gaussiana cuja área é proporcional à concentração do analito (BRETT & BRETT, 1996; DRAKE & VAN DUYNE, 1978).

Figura 9 - Voltametria de pulso diferencial: a) sinal de excitação e b) sinal observado no voltamograma.



Fonte: Reproduzido de Brett & Brett (1996).

Em contraste com as técnicas de varredura linear, as técnicas de pulso (sobretudo a VPD) apresentam melhores limites de detecção porque diminuem a contribuição de correntes não faradáicas na resposta medida. As correntes faradáicas e capacitivas crescem com a aplicação do pulso, mas enquanto a primeira decai linearmente com o tempo, a segunda decai de forma exponencial fazendo com que seu tempo de vida seja menor. Além disso, a contribuição da corrente capacitiva é diminuída ao se medir a corrente no início e no final do pulso (diminuição da corrente de fundo). Assim, escolhendo um tempo ideal para realizar a segunda leitura é possível obter resultados cujas correntes capacitivas sejam desprezíveis e, com isso, obter limites de detecção da ordem de  $10^{-8}$  M (DRAKE & VAN DUYNE, 1978; COMPTON, et al., 2011).

Por sua alta sensibilidade e resolução de sinal, a VPD é usada como alternativa para a análise de compostos naturais. Escarpa e colaboradores estabeleceram protocolos eletroquímicos para estabelecer o conceito de “índice eletroquímico” obtido através de uma corrente amperométrica total a um potencial controlado e caracterizado por uma representação da concentração de “polifenóis totais” em amostras livres de outros componentes oxidantes ou para representar a quantidade de “antioxidantes naturais totais” nas amostras que contém vários tipos de antioxidantes. Neste trabalho, os autores fazem uma correlação entre o potencial de oxidação e “poder antioxidante” e descrevem que substâncias com baixo potencial de oxidação possuem alto poder antioxidante, pois apresentam maior facilidade em transferir elétrons (ESCARPA, GONZÁLEZ, & BLASCO, 2004).

Como a voltametria de pulso diferencial permite a identificação de diversas substâncias eletroativas em um mesmo voltamograma (desde que seus potenciais de oxidação das espécies sejam distinguíveis), uma expressão para o índice eletroquímico (IE) foi desenvolvida e considera os valores de corrente de pico e potencial de pico de cada sinal eletroquímico observado no voltamograma de pulso diferencial:

$$IE = \frac{I_{p1}}{E_{p1}} + \frac{I_{p2}}{E_{p2}} + \dots + \frac{I_{pn}}{E_{pn}} \quad (3)$$

Onde  $I_{p1}$  é a corrente de pico da oxidação 1 e o  $E_{p1}$  é o potencial de pico da mesma oxidação. O IE é a soma das razões de todos os sinais eletroquímicos observados (CONTRERAS-CALDERÓN, et.al, 2018).

É importante ressaltar que o índice eletroquímico demonstra o potencial antioxidante de uma amostra através de suas substâncias eletroativas em certas condições experimentais que são sensíveis ao tipo de eletrodo, eletrólito suporte, pH, técnica de análise e etc. Desta forma, o IE não deve ser tomado com uma grandeza universal mas como um indicativo da ação antioxidante entre classes de compostos (CONTRERAS-CALDERÓN, et.al, 2018).

### 2.3 Compostos naturais

Os compostos ou produtos naturais são conhecidos por apresentarem propriedades alimentícias, farmacológicas e/ou cosméticas. Geralmente, as propriedades farmacológicas e cosméticas desses produtos estão associadas a sua capacidade de inibir e/ou restaurar os danos causados por estresse que provocam lesões às células do organismo, isso, porque, essas substâncias possuem em sua composição compostos químicos de variadas classes que as confere a capacidade de atuar como agentes antioxidantes (REIS et. al. 2009).

Os antioxidantes são substâncias heterogêneas normalmente formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outras espécies vegetais que contribuem para inibir o efeito de radicais livres no organismo. Esses radicais são substâncias que contém um ou mais elétrons desemparelhados que os tornam instáveis e conseqüentemente quimicamente reativos atacando proteínas, lipídios e até mesmo ao DNA. O dano provocado pelos radicais livres no organismo é chamado de estresse oxidativo e tem sido apontado como o responsável pela

ocorrência de doenças cardíacas, arteriosclerose, além de alguns tipos de câncer, Alzheimer e diabetes (BIANCHI & ANTUNES, 1999, SOUSA, et al., 2014).

Uma substância pode ser considerada antioxidante se “em pequenas quantidades, em comparação com o substrato oxidável, é capaz de atrasar ou inibir de maneira eficaz a oxidação desse substrato” (BLASCO et. al, 2004). Uma substância antioxidante pode inibir a ação dos radicais livres sobre os componentes celulares servindo como molécula alvo para os mesmos. Além disso, podem também atuar no reparo das lesões causadas pelos radicais através da reconstrução das membranas celulares danificadas (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Alguns compostos são conhecidos por apresentarem bom desempenho antioxidante e incluem os ácidos fenólicos, flavonoides, compostos polifenólicos, carotenoides, taninos, catecóis assim como os ácidos ascórbico e cafeico, isso, porque, esses compostos apresentam em sua estrutura alta densidade de elétrons, seja através de ligações  $\pi$ , ou por conter grupos com pares de elétrons isolados, que fazem com que sejam facilmente oxidados. Essas substâncias são amplamente encontradas em produtos naturais comumente utilizados pela indústria alimentícia e farmacêutica e são provavelmente os responsáveis pelas propriedades antioxidantes observadas (BARA, et al., 2008).

A alta densidade eletrônica destes compostos comumente encontrados em produtos naturais faz com os mesmos sejam bons candidatos a apresentar eletroatividade. Assim, técnicas eletroquímicas podem ser utilizadas para avaliar, detectar e quantificar tais substâncias em compostos naturais das mais variadas origens.

### ***2.3.1 Análise eletroquímica de compostos naturais***

Técnicas eletroquímicas podem ser ferramentas úteis na caracterização de compostos naturais que apresentam as características até aqui citadas, pois podem fornecer informações quanto ao potencial redox, número de elétrons envolvidos na etapa de transferência de carga, mecanismos de reação dentre outros (REIS, et al., 2009).

A maioria dos trabalhos que avaliam a atividade eletroquímica de produtos naturais é realizada em meio apolar. Os principais motivos para a investigação eletroquímica de produtos naturais em eletrólitos orgânicos são solubilidade e estabilidade. Isso porque os

mecanismos de reação dos componentes presentes em produtos naturais estão frequentemente relacionados com a produção de radicais intermediários que costumam reagir rapidamente com a água. Além disso, a maioria dos componentes encontrados em produtos naturais são substâncias altamente apolares que na maioria das vezes são extraídos da matriz com auxílio de solventes orgânicos. Assim, a baixa polaridade faz com que seja difícil solubilizar as amostras em eletrólitos polares e dificulte sua análise em meio aquoso (GRYGAR et al., 2002).

Uma alternativa à baixa solubilidade de extratos naturais é a investigação da atividade eletroquímica por técnicas voltamétricas em estado sólido através da deposição da substância na superfície do eletrodo e sua posterior avaliação em um eletrólito aquoso. A técnica de voltametria de micropartículas imobilizadas (VIM) tem sido cada vez mais utilizada como ferramenta para a análise de produtos naturais por sua simplicidade, baixo custo e possibilidade de obtenção de informações eletroquímicas de forma similar às obtidas pelas técnicas tradicionais desenvolvidas em solução (GRYGAR et al., 2002).

A imobilização de componentes de extratos naturais pode ser feita através da transferência mecânica da substância sólida (normalmente na forma de um pó fino) para a superfície de um eletrodo preparado para receber o material ou através de um filme formado pela precipitação do material disperso em um solvente orgânico que é evaporado da superfície do eletrodo antes da análise eletroquímica (SILVEIRA et al., 2020).

Assim como nas técnicas tradicionais, a voltametria em estado sólido permite a investigação da atividade eletroquímica de substâncias puras e de extratos brutos. Para amostras puras como padrões ou produtos finais de processos de extração e purificação, a avaliação por voltametria em estado sólido permite observar sinais de oxidação e/ou redução de espécies eletroativas assim como ser capaz de determinar mecanismos de reação pelos quais essas transformações ocorrem. Para extratos brutos é possível determinar grupos de substâncias que apresentam atividades eletroquímicas em determinadas regiões de potencial bem como suas facilidades em doar ou receber elétrons (SILVEIRA et al., 2020).

A imobilização de extratos sólidos realizada mecanicamente geralmente requer que a superfície do eletrodo esteja modificada com alguma substância que facilite a adsorção do sólido na superfície inerte. O eletrodo inerte mais amplamente utilizado é o de grafite por sua ampla janela de potencial, baixo custo e facilidade de processamento, e, a parafina é comumente utilizada como agente de imobilização dessas partículas. Esse tipo de eletrodo

modificado é chamado de eletrodo de grafite impregnado com parafina (PIGE). Alguns trabalhos avaliam a atividade eletroquímica de extratos naturais por essa metodologia: Komorsky-Lovrić & Novak (2009), avaliaram a atividade eletroquímica de chás verde e preto por voltametria de onda quadrada. Os chás em pó foram imobilizados na superfície de PIGE e os perfis voltamétricos mostraram a presença de flavonoides que tiveram seus picos comparados com os observados em padrões dessa classe de compostos permitindo a determinação dos componentes sem a necessidade de uma extração prévia.

A imobilização de extratos sólidos através da formação de filmes por evaporação de solventes geralmente não necessita de modificação previa do eletrodo de trabalho. O extrato em uma suspensão é depositado em pequenas quantidades na superfície do eletrodo e o solvente é então evaporado, em uma técnica chamada “drop-casting”. Como resultado, observa-se a formação de uma fina camada de material distribuída na superfície do eletrodo formando uma espécie de filme, a análise desse material de forma similar ao da PIGE permite identificar substâncias eletroativas presentes na matriz (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2013; GAO, SCULLY, & ZUO, 2021)

Domínguez & Doménech-Carbó (2015) avaliaram diversos tipos de folhas de chás através da microextração em etanol e deposição de partículas na superfície do eletrodo de carbono vítreo onde foi possível detectar sinais correspondentes à classe de diferentes compostos polifenólicos sendo possível com auxílio ferramentas quimiométricas distinguir diferentes tipos de chás através de seus sinais eletroquímicos. Esta técnica também foi utilizada por Doménech-Carbó e colaboradores (2017) para determinar espécies vegetais em objetos de madeira através de microextração em diferentes solventes orgânicos e posterior deposição na superfície do eletrodo. Os voltamogramas mostraram a presença de polifenóis que foram identificados em cada caso através da comparação dos voltamogramas com perfis de padrões para essa classe de compostos.

#### *2.3.1.1 Caracterização eletroquímica de carotenoides*

Por apresentarem estrutura química com várias ligações duplas conjugadas, e, algumas vezes, grupos funcionais doadores de elétrons, os carotenoides são excelentes candidatos a apresentarem atividade eletroquímica. De fato, tanto os carotenoides quanto os compostos

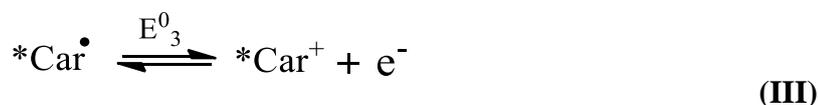
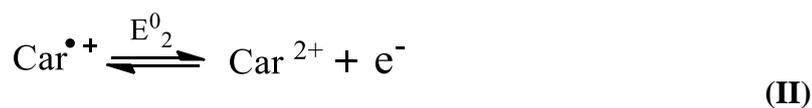
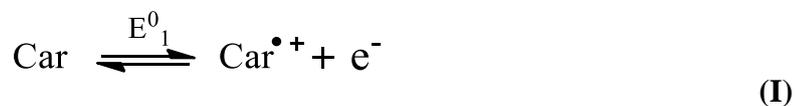
que os contém têm sido investigados quanto ao seu comportamento eletroquímico por diferentes técnicas e em diferentes meios.

### 2.3.1.1.1 Caracterização em meio orgânico

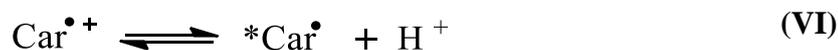
Carotenoides podem ser oxidados eletroquimicamente através de reações de dois elétrons. Vários trabalhos associam a essa oxidação mecanismos que envolvem a formação de cátions e/ou dicátions radicais. Por produzirem intermediários altamente reativos os carotenoides são comumente avaliados em solventes orgânicos que permitem que os mesmos se movimentem livremente na solução assim como conferem certa estabilidade para os radicais catiônicos produzidos. (KISPERT et al., 1997; GAO et al., 2003 ).

Em solventes orgânicos, a reação de carotenoides via formação de radicais tem o seguinte mecanismo proposto (LIU et al.,2000; FOCSAN et al., 2014) :

Reações de eletrodo heterogêneo:



Reações químicas homogêneas:



Reações colaterais:



Onde: Car é o carotenoide em sua forma neutra;  $\text{Car}^{\bullet+}$  é o cátion radical do carotenoide;  $\text{Car}^{2+}$  é o dicátion carotenoide;  $*\text{Car}^+$  é o cátion carotenoide desprotonado;  $*\text{Car}^{\bullet}$  cátion radical desprotonado.

Diversos carotenoides foram avaliados por voltametria cíclica e/ou de onda quadrada em solventes como acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), tetrahidrofurano (THF) e diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) puro ou em mistura com tetrabutilamônio tetrafluoroborato ( $\text{TBABF}_4$ ) ou tetrabutilamônio hexafluorofosfato (TBAHFP). O perfil eletroquímico observado depende do carotenoide avaliado e do solvente utilizado.

Para o  $\beta$ -caroteno, um dos carotenoides mais conhecidos e estudados, o comportamento eletroquímico observado depende do solvente utilizado (prótico ou aprótico), mas sempre envolve a transferência de dois elétrons que ocorrem quase ao mesmo tempo, pois produz intermediários bastante reativos. A transferência desses elétrons foi considerada quase reversível por Liu e colaboradores (2000) usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{TBAHFP}$  como eletrólito suporte e considerada irreversível por Park (1978) usando THF. O licopeno e astaxantina são outros carotenoides bastante estudados. Para o licopeno, transferência de dois elétrons foi considerada quase reversível em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{TBAHFP}$  (LIU et al., 2000). Um comportamento semelhante foi observado para a astaxantina, que teve seus elétrons transferidos de forma quase reversível em TBAHFP (FOCSAN et al., 2014) e de forma reversível em clorofórmio (HAN, et al., 2006) .

A bixina, carotenoide em maior quantidade nas sementes de urucum, foi avaliada eletroquimicamente por Tay-agbozo e colaboradores (2018). Neste estudo, o carotenoide foi extraído das sementes e pó comercial utilizando hexano como solvente, e, o extrato final (sólido) foi dissolvido em THF de duas qualidades: um sem qualquer tipo de pré-tratamento e

outro destilado em laboratório. Ambos os extratos foram avaliados por voltametria cíclica utilizando o TBAHFP como eletrólito suporte. Como resultado, os autores observaram que os extratos de bixina em THF com e sem destilação sofrem oxidação irreversível com a perda de dois elétrons. A primeira via formação de radical cátion (reação 1) e a segunda via formação do dicátion (reação 2), reações que ocorrem em 0,94 V e 1,14 V respectivamente.

#### 2.3.1.1.2 Caracterização em meio aquoso

Como mencionado, a avaliação de produtos naturais em meio aquoso apresenta limitações de solubilidade e estabilidade dos intermediários produzidos. No entanto, alguns trabalhos realizam estudos de alguns carotenoides em meio aquoso através de voltametria de compostos em solução ou em estado sólido.

Munoz e colaboradores avaliaram o comportamento da astaxantina em uma mistura acetona, diclorometano e água contendo  $\text{HClO}_4$  0,1 M. Os autores observaram que nessas condições este carotenoide sofre oxidação irreversível com perda de dois elétrons. A irreversibilidade do processo foi associada à reatividade do cátion radical produzido na perda do primeiro elétron, e, como resultado, a transferência do segundo elétron ocorre quase simultaneamente com primeira (MUNOZ, et al., 2016).

Cizmek & Komorsky-Lovrié (2019) avaliaram atividade eletroquímica dos carotenoides  $\beta$ -caroteno, astaxantina e luteína em estado sólido. A voltametria de micropartículas foi utilizada através de duas metodologias: carotenoides na forma sólida foram transferidos mecanicamente para a superfície do PIGE e uma alíquota dos carotenoides solubilizados em acetona foi precipitada na superfície do PIGE e em seguida o solvente foi evaporado. As medidas eletroquímicas em ambos os casos foram realizadas por voltametria cíclica e de onda quadrada utilizando como eletrólito suporte  $\text{HClO}_4$  0,1 M em pH 1,5.

Para a técnica de imobilização de partículas na superfície da PIGE, os autores observaram que a astaxantina e  $\beta$ -caroteno sofreram oxidação completamente irreversível. A luteína não apresentou comportamento eletroquímico significativo nesta metodologia. Novamente a irreversibilidade do sistema é associada à reatividade do cátion radical produzido nas reações do eletrodo que faz com que produtos desconhecidos sejam formados impossibilitando que a reação inversa seja observada.

Na técnica de precipitação de um filme de carotenoide na superfície do PIGE a astaxantina mostrou um comportamento reversível para a transferência do primeiro elétron e irreversível para a perda do segundo elétron. O mecanismo proposto para a oxidação da astaxantina nessas condições é a formação de um radical alila na primeira oxidação promovida pela reação de grupos cetônicos conjugados com as duplas ligações, seguida da segunda transferência de elétron onde um diol é formado.

A oxidação da luteína nessas condições mostrou-se irreversível. O mecanismo proposto para a oxidação desse carotenoide inclui a produção de um cátion radical durante a transferência do primeiro elétron seguida da formação de um diol na segunda oxidação. O  $\beta$ -caroteno também sofreu oxidação irreversível nessas condições e o mecanismo proposto para sua oxidação envolve a formação de um cátion radical na transferência do primeiro elétron. A partir disso, o cátion radical pode reagir de duas formas: formando um diol como as demais substâncias ou produzindo um epóxido.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade eletroquímica de extratos de urucum (*Bixa orellana L.*) em meio aquoso através de técnicas de deposição em superfície.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Realizar caracterizações espectroscópicas para identificar as principais substâncias presentes nos extratos e nas sementes de urucum.

Realizar caracterizações eletroquímicas em diferentes superfícies para verificar a existência de espécies eletroativas presentes nos extratos de urucum.

Identificar as espécies eletroativas presentes nos extratos de urucum.

Avaliar o mecanismo de oxidação do componente ativo dos extratos de urucum.

Avaliar o poder antioxidante dos extratos de urucum e compará-lo com outros carotenoides.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Compostos químicos

Acetonitrila- $\text{CH}_3\text{CN}$  (PA, Synth); Ácido Sulfúrico -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (PA, 68-60%, Química Moderna); Água Destilada e Deionizada-  $\text{H}_2\text{O}$ ; Alumina -  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Suspensão, Fortel 1500- 0,2; 0,5 e 1,0 $\mu$ ); Cloreto de Potássio -  $\text{KCl}$  (PA, Synth); Clorofórmio -  $\text{CHCl}_3$  (PA, Synth); Etanol -  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (PA, Dinâmica); Grafite em pó (< 20 $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich); Hidróxido de Sódio- $\text{NaOH}$  (PA, Synth); Óleo mineral comercial (Nativita, puríssimo); Peróxido de hidrogênio-  $\text{H}_2\text{O}_2$  (PA, 37%, Neon); Sementes de urucum obtidas de uma planta localizada em Camaragibe, Pernambuco; Sulfato de Sódio- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (PA, Moderna);

### 4.2 Materiais, equipamentos e software's

Célula eletroquímica de dois compartimentos (20 mL). Célula eletroquímica de cavidade (50 mL). Eletrodos de trabalho de carbono vítreo ( $A = 0,085 \text{ cm}^2$ ), ouro ( $A = 0,018 \text{ cm}^2$ ) ambos da marca BAS electrochemistry, disco de ouro ( $A = 0,057 \text{ cm}^2$ ) e cavidade ( $A = 0,059 \text{ cm}^2$ ). Eletrodo auxiliar de fio em espiral ou rede de platina. Eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  em  $\text{KCl}$  (sat). Potenciostado/galvanostato EG&G 263A. Potenciostato/galvanostato Gamry ZRA 600. Software PowerSuit 2.35.2. Software Gamry Framework. Software Origin 8.5.

### 4.3 Procedimento Experimental

#### 4.3.1 *Tratamento das sementes e obtenção do extrato*

No laboratório, as sementes foram separadas de suas cápsulas, peneiradas para remoção de pequenos insetos e colocadas em placas de petri. A secagem foi realizada em estufa durante 8h a 60°C. Em seguida, as sementes foram trituradas, transferidas para eppendorf's envolvidos com papel alumínio e armazenadas na geladeira.

5 mg de sementes de urucum foram submetidas a extração em 5 mL de etanol ou acetonitrila. Para isso, a mistura sementes/solvente foi transferida para um tubo falcon (coberto com papel alumínio) e agitada por 30 min. Em seguida, os extratos de coloração avermelhada foram filtrados e armazenados em tubos falcon envoltos em papel alumínio na geladeira.

#### **4.3.2 Caracterização espectroscópica**

##### *4.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho*

As análises de infravermelho ATR foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LABMAQ) do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em um espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR e Refletância Total Atenuada (ATR) da marca Shimadzu IR Tracer-100 com cristal do ATR de diamante e seleneto de zinco. As leituras foram realizadas diretamente sobre a superfície das sementes secas.

As análises de infravermelho em KBr para as sementes de urucum e extratos de urucum foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) usando um equipamento IR Tracer-100 Shimadzu. Para as análises, 5mg das sementes secas foram maceradas em almofariz e pistilo e o pigmento transferido para o recipiente durante a maceração foi incorporado em KBr até que uma mistura homogênea fosse observada. Em seguida, a mistura foi utilizada para a preparação das pastilhas.

##### *4.3.2.2 Espectroscopia UV-Vis*

As análises de UV-Vis foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LABMAQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em um espectrofotômetro da marca PerkinElmer modelo lâmbda 650. O registro dos espectros foi realizado utilizando os extratos dissolvidos em seus respectivos solventes (acetonitrila ou etanol).

### 4.3.2.3 Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas na central de análises do Programa de Pós Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em um espectrofotômetro Raman-AFM Horiba modelo IHR320 com laser de Nd:YVO<sub>4</sub> com comprimento de onda de 671 nm. Para a análise, o extrato em etanol foi evaporado na superfície de uma placa de vidro até que um filme espesso pudesse ser observado e em seguida o espectro raman do filme foi registrado. Os parâmetros usados para a obtenção dos espectros estão descritos na tabela 1:

**Tabela 1 - Parâmetros de obtenção dos espectros Raman dos filmes de extrato de urucum**

Lente	Faixa (cm <sup>-1</sup> )	Tempo de aquisição (s)	Acumulações
10	500-2000	10	5
100			10

Fonte: A autora (2023).

### 4.3.3 Medidas eletroquímicas

#### 4.3.3.1 Célula eletroquímica

Os experimentos feitos com eletrodos cilíndricos foram realizados em uma célula com dois compartimentos de 20 mL. Esta célula foi escolhida para manter o eletrodo de referência em um compartimento separado dos eletrodos de trabalho e auxiliar, e, com isso,

evitar a interferência dos íons cloretos nele presente. Experimentos realizados com o eletrodo de disco foram realizados em uma célula eletroquímica de cavidade de 50 mL. Ambas as células foram lavadas previamente com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, e, em seguida, enxaguadas com bastante água destilada. Um sistema de três eletrodos foi utilizado em ambas às células.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1 M foi utilizado como eletrólito suporte. Todas as medidas eletroquímicas deste trabalho foram realizadas no mínimo em triplicata.

#### 4.3.3.2 *Fabricação do eletrodo de referência*

Neste trabalho foi utilizado um eletrodo de referência de Ag/AgCl em KCl (sat). Este eletrodo é fabricado e montado em laboratório através do seguinte procedimento:

Um fio de prata com 1,5 mm de diâmetro e 4,5 cm de comprimento foi soldado em um fio de cobre por solda elétrica para servir de contato elétrico. A solda foi posteriormente revestida com araldite para promover o isolamento. Em seguida o fio de prata foi mergulhado em  $\text{HNO}_3$  3 M durante 20 min e depois foi enxaguado com bastante água destilada. O fio foi então colocado como eletrodo de trabalho em uma célula contendo HCl 0,1 M enquanto um segundo eletrodo de rede de platina é usado como eletrodo auxiliar. Posteriormente, foi aplicada à célula uma corrente de 1,8 mA (proporcional à área do fio de prata) durante duas horas para que ocorresse a deposição de cloreto de prata ao longo do fio. Ao fim do processo, o fio de Ag/AgCl ficou mergulhado em água destilada por 24 h para estabilização da camada depositada.

Por fim, adicionou-se ao fio um septo de borracha e o mesmo foi inserido em um tubo de vidro com uma membrana porosa de vycor® na extremidade inferior. O vidro foi preenchido com uma solução de KCl saturada tendo o cuidado para que em seu interior sempre houvesse alguns cristais de KCl para garantir que a concentração de íons cloreto dentro do eletrodo seja constante. Após a fabricação, o eletrodo é armazenado em um frasco âmbar com uma solução de KCl saturada. O esquema de fabricação deste eletrodo é mostrado a seguir:

**Figura 10 - Procedimento de fabricação do eletrodo de referência de Ag/AgCl em KCl (sat).**



Fonte: Adaptado de Areias & Silva (2000).

O funcionamento adequado do eletrodo é monitorado através de medidas eletroquímicas e sempre que se observam deslocamentos de potencial o eletrodo é refeito. Neste trabalho, todos os potenciais são medidos em relação a este eletrodo de referência.

#### 4.3.3.3 Tratamento da superfície do eletrodo de trabalho

Alguns tratamentos de superfície foram avaliados durante esse trabalho para determinar qual seria o mais adequado para os eletrodos de trabalho fornecendo superfícies limpas, reproduzíveis e se possível aumentando sua sensibilidade ao extrato avaliado.

##### 4.3.3.3.1 Eletrodo de carbono vítreo (ECV)

A limpeza da superfície do eletrodo de carbono vítreo é realizada com o intuito de se obter uma superfície espelhada e livre de resíduos. Para isso, o seguinte procedimento foi adotado:

- 1- Polimento em alumina 1,0  $\mu\text{m}$  por 5 min.
- 2- Ultrassom em água destilada por 10 min trocando a água do béquer a cada 5min
- 3- Polimento em alumina 0,5  $\mu\text{m}$  por 5 min.
- 4- Repetir a etapa 2

5- Polimento em alumina 0,2  $\mu\text{m}$  por 5 min.

6- Repetir a etapa 2

Esse procedimento mostra-se eficaz na obtenção de voltamogramas livres de impurezas e reprodutíveis.

#### 4.3.3.3.2 Eletrodo policristalino de ouro

Como a superfície do eletrodo de ouro é mais sensível a presença de impurezas o seguinte procedimento foi utilizado:

1. Polimento em alumina 1,0  $\mu\text{m}$  por 2 min
2. Ultrassom em água destilada por 10 min trocando a água do béquer a cada 5 min
3. Polimento em alumina 0,5  $\mu\text{m}$  por 2 min.
4. Repetir a etapa 2
5. Polimento em alumina 0,2  $\mu\text{m}$  por 2 min.
6. Repetir a etapa 2
7. Eletropolimento em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M entre a janela de potencial de -0,4 a 1,8 V realizando 90 ciclos a  $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$
8. Varredura a  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  entre -0,2-1,6 V.

A limpeza da superfície é verificada através da varredura em baixa velocidade (etapa 8) onde se analisa os picos de oxidação e redução do voltamograma. Este procedimento costuma apresentar picos bem definidos um voltamograma reproduzível.

#### 4.3.3.3.3 Eletrodo de disco de ouro

O procedimento de limpeza do eletrodo de disco de ouro foi realizado através do seguinte procedimento:

1. Mergulhar o eletrodo em solução piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  3:1) durante 10min.

2. Ultrassom em água destilada por 10 min trocando a água do béquer a cada 5min
3. Polimento em alumina 1,0  $\mu\text{m}$  por 2 min
4. Repetir a etapa 2
5. Polimento em alumina 0,5  $\mu\text{m}$  por 2 min.
6. Repetir a etapa 2
7. Polimento em alumina 0,2  $\mu\text{m}$  por 2 min.
8. Repetir a etapa 2
9. Eletropolimento em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M entre a janela de potencial de -0,4 a 1,8 V
10. Varredura a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,2-1,4 V.

O procedimento adotado para a limpeza do eletrodo de ouro policristalino não garantiu uma limpeza eficiente da superfície do eletrodo de disco, e, por esta razão o uso de solução piranha foi adotado na etapa inicial.

#### 4.3.3.3.4 Eletrodo de pasta de carbono (EPC)

**Preparação da pasta:** A pasta de carbono foi preparada através da mistura de pó de grafite ( $< 20 \mu\text{m}$ ) e óleo mineral comercial em diferentes proporções. Clorofórmio (Máx: 2 mL) foi adicionado à mistura para facilitar sua homogeneização. Após a completa evaporação do solvente, a pasta foi transferida para um vidro âmbar e armazenada na geladeira. O EPC é montado em um eletrodo de cavidade ( $d= 2,74 \text{ mm}$ ) e sua preparação seguiu as etapas:

1. Mergulhar o eletrodo em solução piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  3:1) durante 10min.
2. Ultrassom em água destilada por 10 min trocando a água do béquer a cada 5min
3. Secagem da cavidade com o auxílio de uma pisseta vazia
4. Adição da pasta de carbono
5. Polimento da superfície em papel A4

O eletrodo preparado sob essas condições mostrou-se reprodutível.

#### 4.3.3.4 Técnicas eletroquímicas

Os extratos de urucum foram avaliados através da voltametria cíclica em eletrodo de ouro e carbono vítreo em diferentes eletrólitos e velocidades de varredura através dos seguintes parâmetros:

**Tabela 2 - Parâmetros usados na voltametria cíclica para a avaliação dos extratos de urucum.**

<b>Eletrodo</b>	<b>Janela de potencial (V)</b>	<b>Velocidades de varredura (mV.s<sup>-1</sup>)</b>
Policristalino Au	-0,2 – 1,6; 0,3 - 1,0	5;10;20;50
Carbono vítreo	0,0 - 1,0	1;5;10;20;50
Disco Au	-0,2 - 1,4	20
EPC	0,0 - 1,0	5;10;20;40;

Fonte: A autora (2023).

Os parâmetros usados nos experimentos de voltametria de pulso diferencial foram ajustados de modo que o sinal do extrato apresentasse um pico mais definido, esses foram os seguintes:

**Tabela 3 - Parâmetros usados na voltametria de pulso diferencial para a avaliação dos extratos de urucum.**

<b>Amplitude de pulso (V)</b>	80
<b>Incremento de pulso (V)</b>	3
<b>Período (s)</b>	0,8
<b>Velocidade de varredura (mV.s<sup>-1</sup>)</b>	5

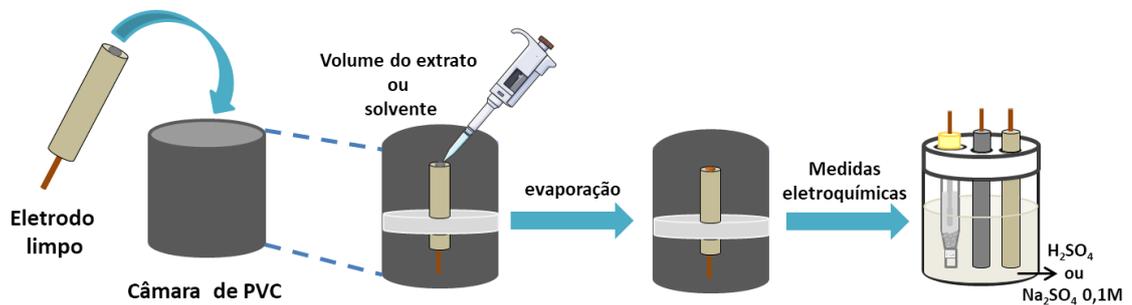
Fonte: A autora (2023).

#### 4.3.4 Avaliação do extrato

A deposição do extrato nas superfícies dos eletrodos através da técnica “drop-casting” foi usada como recurso para avaliação do extrato em meio aquoso através do seguinte procedimento (fig. 11):

- 1- O eletrodo, previamente limpo, é fixado em um compartimento escuro com sua superfície voltada para cima. Esse compartimento é utilizado para diminuir a exposição do extrato depositado à luz enquanto o solvente evapora.
- 2- Um volume do extrato em solvente volátil é depositado na superfície do eletrodo.
- 3- Aguarda-se a total evaporação do solvente e formação do filme de extrato de urucum na superfície do eletrodo.
- 4- O filme é avaliado eletroquimicamente.

**Figura 11 - Esquema de deposição dos extratos na superfície dos eletrodos de trabalho.**



Fonte: A autora (2023).

O tempo de secagem e a quantidade de extrato utilizado de acordo com cada eletrodo são:

**Tabela 4 - Informações dos extratos depositados em cada eletrodo de trabalho.**

Eletrodo	Extrato	Volume Depositado (µL)	Tempo de secagem (min)	Polimento após secagem

---

Carbono vítreo	Diluído (1:20)	10	40	Não
Policristalino Au	Diluído (1:20)	10	40	Não
Disco Au	Bruto	5	40	Não
EPC	Bruto	3,5,8 e 10	60	Sim

---

Fonte: A autora (2023).

Após esse procedimento, um filme de coloração alaranjada é observado na superfície dos eletrodos, com exceção do EPC. O procedimento de limpeza do eletrodo e deposição filme é reiniciado a cada novo experimento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

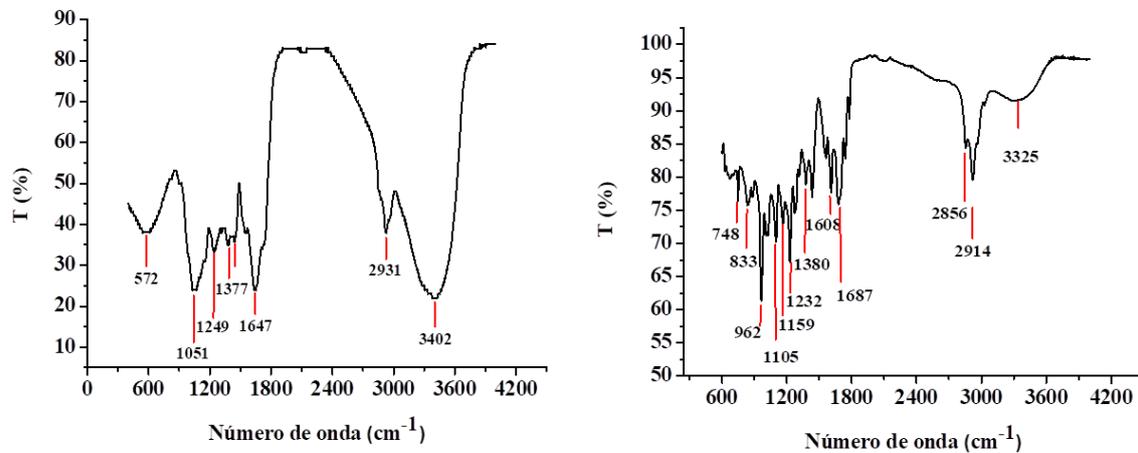
### 5.1 Caracterização espectroscópica do urucum

#### 5.1.1 Sementes

##### 5.1.1.1 Espectroscopia no infravermelho

As sementes tratadas e armazenadas conforme descrito no procedimento experimental foram trituradas e avaliadas por espectroscopia no infravermelho usando as técnicas de transmissão em pastilhas de KBr e reflexão por ATR. Os perfis obtidos para cada técnica são mostrados na figura 12:

Figura 12 - Espectros de infravermelho das sementes de urucum: a) FTIR em KBr e b) FTIR ATR.



Fonte: A autora (2023).

Sinais referentes à hidroxila de grupo ácido são observados na região 2800-3500  $\text{cm}^{-1}$ . Essa banda costuma ter sinal largo e intenso que geralmente se sobrepõe a sinais de estiramentos de ligações C-H. Os picos 1647  $\text{cm}^{-1}$  e 1687  $\text{cm}^{-1}$  (figuras a e b) são referente ao grupo carboxila (C=O) que geralmente é deslocado para frequências mais baixas quando há conjugação com C=C ou grupo fenila. Estiramentos de ligação C-O são comumente observados na região de 1210-1380  $\text{cm}^{-1}$  com intensidade moderada. Nestes espectros, os estiramentos estão em 1377  $\text{cm}^{-1}$  e 1380  $\text{cm}^{-1}$ , nas figuras a e b respectivamente. Há também

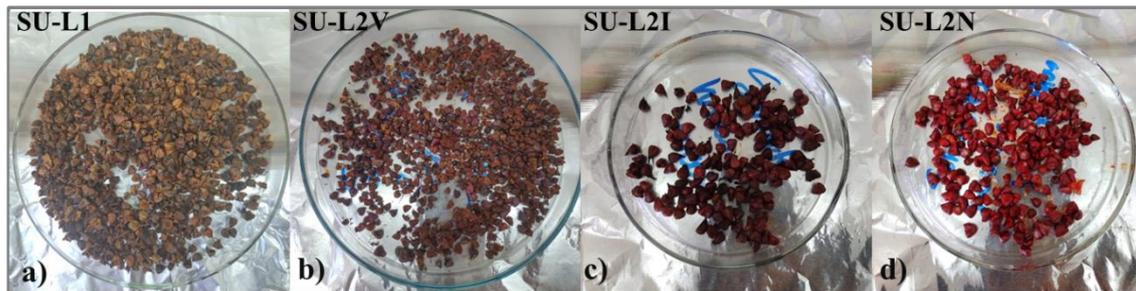
sinais de estiramento =C-H fora do plano em alcenos na faixa de 1000-650  $\text{cm}^{-1}$  (PAVIA et al., 2015).

Esses picos são indicativos da presença de grupos funcionais presentes na bixina, carotenoide em maior quantidade no urucum e responsável pela coloração das suas sementes. Uma consulta ao espectro da bixina pura na plataforma de espectros de compostos orgânicos (SDBS) mostra que há boa concordância entre o espectro da substância e os obtidos neste trabalho embora sejam observadas pequenas diferenças nas posições e intensidades desses picos. É razoável pensar que tais mudanças sejam um reflexo da baixa pureza da amostra, uma vez que as sementes foram usadas “in natura” sem nenhuma extração ou purificação da substância. Alguns trabalhos na literatura relatam distorções de posição e intensidade dos picos da bixina devido ao uso de diferentes solventes para extração ou diferentes graus de purificação da mesma (SILVA, 2007; OLIVEIRA, 2005). Além disso, os demais componentes do urucum citados na seção 2.1.3 possuem grupos funcionais (C-H, -OH- C=C, C=O, C-O) cujos sinais espectroscópicos tendem a aparecer em regiões semelhantes aos da bixina, porém com intensidades diferentes devido a sua baixa incidência. Assim, pode ser que esses sinais tenham sido sobrepostos pelos sinais da bixina e/ou a presença desses compostos cause interferência promovendo o deslocamento dos picos da substância principal.

A presença da bixina nas sementes de urucum faz com que as mesmas apresentem coloração intensa e, normalmente, essa pigmentação é transferida para qualquer superfície em contato com as elas. Entretanto, é visível a diferença de pigmentação exibida para sementes de urucum em diferentes graus de maturação, e é possível observar que sementes em grau de maturação mais avançado (mais velhas) costumam ter sua coloração e capacidade de transfência de pigmentação diminuídas drasticamente.

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada para avaliar sementes de urucum em diferentes graus de maturação quanto a disponibilidade de seu componente principal, a bixina. Para isso, as sementes foram separadas em lotes que permitissem determinar visualmente diferenças em graus de maturação, conforme mostrado na figura 13:

**Figura 13 - Grau de maturação de sementes de urucum (SU); lote 1 (L1): a) armazenadas em estoque desde 2016, lote 2 (L2) recebido em 2020: b) velhas (L2V) , c) intermediárias (L2I), c) novas (L2N);**

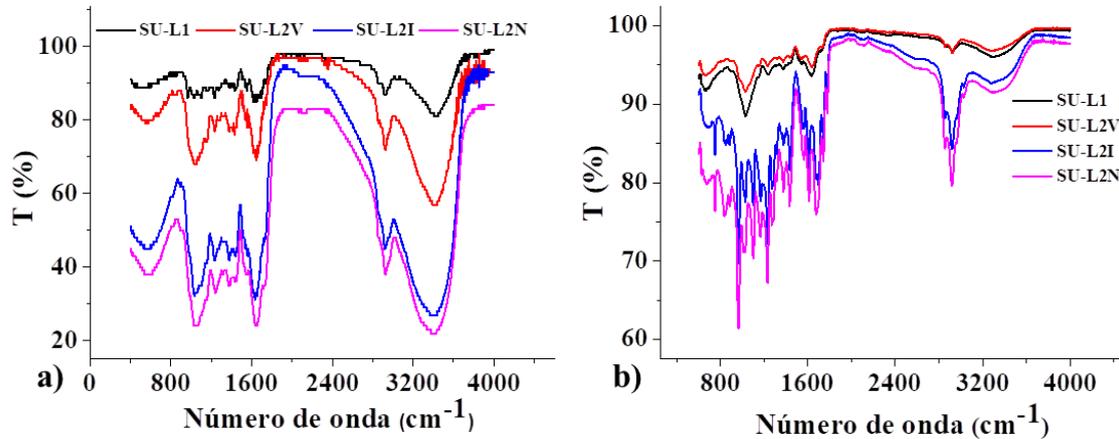


Fonte: A autora (2023).

A sensibilidade de pigmentos a fatores como luz, calor e oxigênio é bem relatada na literatura, e, o fato da maioria dos pigmentos naturais apresentarem cadeias longas e insaturadas (como os carotenoides) os tornam bem sensíveis à degradação e perda de coloração (SCOTTER, 2009; (GALLARDO-CABRERA & ROJAS-BARAHONA, 2015; RAO et. al, 2006). Cabral avaliou a sensibilidade à luz de extratos de urucum em meio aquoso e salino e verificou que soluções contendo extratos de urucum perdiam sua coloração características quando expostas à luz, tornando-se incolores após cerca de um mês de exposição (CABRAL, 2018) . A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada como ferramenta de análise e acompanhamento de mudanças estruturais de compostos suscetíveis a diferentes tipos de degradação, seja ela por tempo ou por ação de agentes agressivos como a luz e o calor (SALUSTIANO, 2019; OLIVEIRA, 2022; AZARIAS, 2017)

Espectros de infravermelho por absorção e ATR das sementes de urucum em diferentes graus de maturação foram obtidos (fig.14). Os espectros mostram o perfil característico da bixina, porém é possível notar uma diminuição gradual das intensidades dos picos a medida que as sementes vão ficando mais velhas (SU-L1 → SU-L2N).

**Figura 14 - Espectros de infravermelho das sementes de urucum: a) FTIR-KBr e b) FTIR-ATR.**



Fonte: A autora (2023).

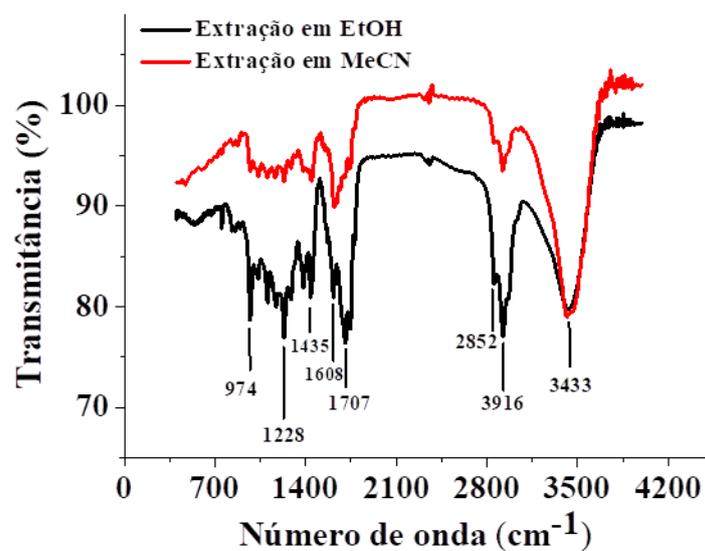
Através dos espectros é possível observar uma diminuição das intensidades dos picos característicos da bixina à medida que sementes mais velhas são avaliadas. Para os espectros em KBr (fig.14-a) essa diminuição pode estar associada a variações experimentais, e mesmo utilizando a quantidades iguais de sementes e realizando o mesmo procedimento de preparação da pastilha, associar a diminuição da intensidade dos picos à quantidade de bixina presente na amostra não é adequado. No entanto, para o IV-ATR (fig.14-b) onde a obtenção dos espectros é feita diretamente sobre as sementes de urucum, essa diminuição de intensidade dos picos pode sim estar associada a uma menor disponibilidade de bixina nas sementes à medida que o grau de maturação aumenta. Ambas as técnicas permitem observar que a resolução dos picos, principalmente os relacionados à cadeia carbônica da bixina, é menor quando as sementes mais velhas (SU-L1) são avaliadas o que ser interpretado como reflexo de possíveis processos de fotodegradação sofridos pelas moléculas do corante presente nas sementes de urucum. Não é possível observar o surgimento de novos picos provenientes da degradação dessas moléculas, nem de outras substâncias presentes no urucum. Considerando que a degradação da bixina resultaria na diminuição da saturação da cadeia ou formação de moléculas menores de hidrocarbonetos, álcoois e ésteres, devido à quebra de ligações, não há motivos para esperar o surgimento de picos em regiões diferentes das já observadas. As alterações observadas espectroscopicamente confirmam a observação visual de que a pigmentação, e, conseqüentemente o teor de bixina presente nas sementes de urucum diminui consideravelmente à medida que as sementes envelhecem; e isso deve ser considerado durante processos de extração e análise desta matriz.

## 5.1.2 Extrato

### 5.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho

Espectros de infravermelho em KBr foram registrados para extratos de urucum obtidos por extração em etanol e acetonitrila. Para isso, os solventes foram evaporados e pequenas quantidades do filme formado foram usadas para preparar as pastilhas. Os espectros obtidos são mostrados abaixo:

**Figura 15 - Espectros de IV-KBr de extratos de urucum extraídos em etanol (EtOH) e acetonitrila (MeCN).**



Fonte: A autora (2023).

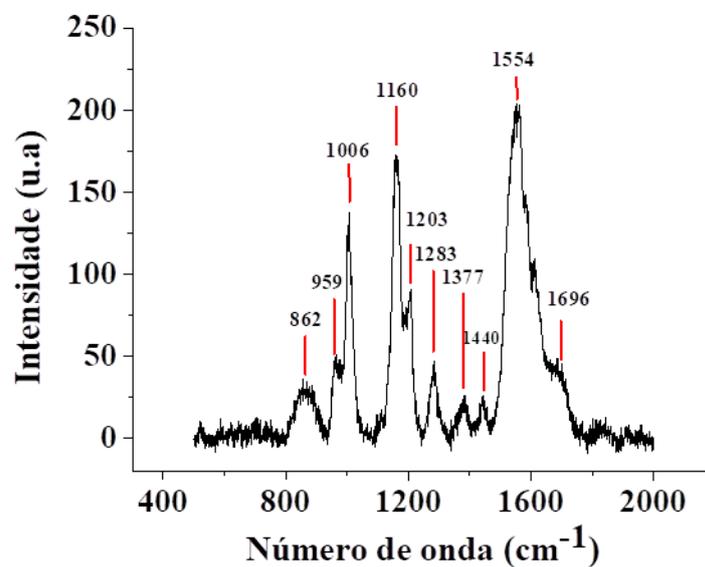
Ambos os espectros apresentam semelhança com os apresentados para as sementes de urucum sob as mesmas condições (fig.12-a). Os sinais observados assemelham-se aos descritos pela literatura para a bixina. Contudo, pequenos deslocamentos na posição dos sinais são observados. Novamente, a diferença pode estar associada à baixa pureza do extrato, uma vez que nenhuma purificação foi realizada.

Comparando os espectros dos dois extratos, é possível notar que a extração em etanol forneceu um espectro com picos mais intensos e definidos que o espectro da extração em acetonitrila, principalmente na região entre 700-2100  $\text{cm}^{-1}$ . Embora ambas as extrações tenham fornecido extratos em quantidade e qualidade semelhantes, a diferença de ambiente químico promovido pelos dois solventes parece ter um efeito na qualidade do espectro obtido.

### 5.1.2.2 Espectroscopia Raman

O extrato de urucum em etanol foi avaliado por espectroscopia Raman. Para isso, volumes de extrato foram evaporados na superfície de uma lâmina de microscópio ( $1 \text{ cm}^2$ ) até que um filme de coloração laranja pudesse ser observado. O espectro obtido é mostrado na figura abaixo:

**Figura 16 - Espectro Raman do filme do extrato de urucum em lâmina de vidro.**



Fonte: A autora (2023).

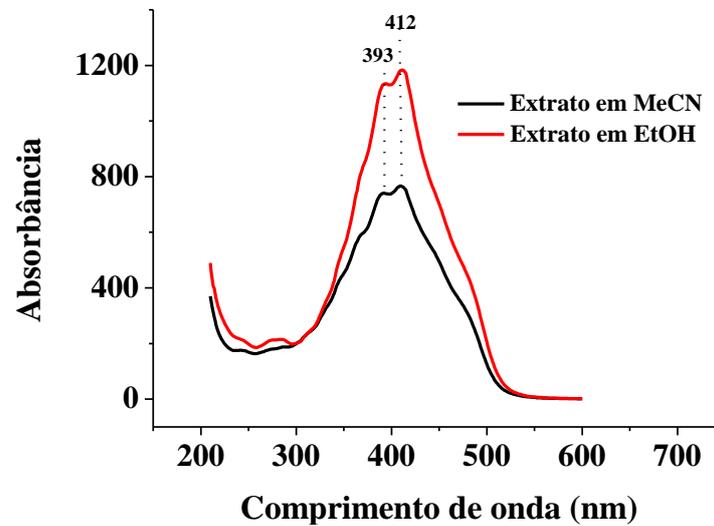
De acordo com o espectro, é possível observar picos atribuídos à cadeia carbônica insaturada da bixina, com vibrações referentes a ligações  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$  em  $1554 \text{ cm}^{-1}$ , estiramentos  $\nu_2(\text{C}-\text{C})$  em  $1160 \text{ cm}^{-1}$  e  $\rho(\text{C}-\text{CH}_3)$   $1006 \text{ cm}^{-1}$ . O sinal referente à carbonila é esperado entre

1750-1600  $\text{cm}^{-1}$ . É comum que este sinal esteja muito próximo ao do estiramento  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ , e nestes casos, um pico largo com uma espécie de “ombro” é observado. Para o extrato em estudo, o pico referente ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{O})$  é observado em 1696  $\text{cm}^{-1}$ . O estiramento de ligações C-O-C esperado entre 800-1200  $\text{cm}^{-1}$  é observado em 862  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, um pico referente a ligações C-C-H é observado em 1283  $\text{cm}^{-1}$  (SCHULZ, BARANSKA, & BARANSKI, 2005; (WITHNALL, et.al, 2003). Esses sinais estão em relativa concordância com os observados por Constantino e colaboradores para este corante e, segundo os autores, pequenos deslocamentos nas posições dos picos (também observados neste trabalho) podem ser causados pela presença de isômeros do carotenoide na matriz (CONSTANTINO, et al., 2020). Embora a extração a frio favoreça a obtenção majoritária de bixina na forma cis, é possível que a presença de seu isômero, mesmo que em menor quantidade, seja responsável pelos pequenos deslocamentos de sinais observados. Além disso, Oliveira e colaboradores avaliariam o efeito do solvente usado durante a extração sobre a qualidade do espectro Raman da bixina e os autores observaram que o uso de diferentes solventes interfere tanto na posição dos picos quanto na resolução dos sinais da bixina pura por (OLIVEIRA, et al., 2020).

### 5.1.2.3 Espectroscopia no UV-Vis

O princípio da espectroscopia do ultravioleta-visível é interação da matéria com a luz, essa interação faz com que a substância sofra uma excitação energética e o retorno para um estado de menor energia dá origem a um espectro (PAVIA, LAMPMAN, KRIZ, & VYVYAN, 2015). Extratos de urucum em etanol e acetonitrila foram avaliados por espectroscopia UV-Vis. Os espectros de cada amostra são exibidos na figura 17:

Figura 17 - Espectros de UV-Vis dos extratos de urucum.



Fonte: A autora (2023).

Carotenoides são conhecidos por apresentarem sinais de absorção na faixa de 350-500 nm, com intensidades máximas de absorção entre 450-480 nm que estão associadas a transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  das duplas ligações conjugadas da cadeia carbônica (TRIGUEIRO NETO, 2018). Esses sinais geralmente apresentam-se em três picos, sendo o segundo mais intenso e utilizado para identificar a espécie analisada. A bixina e norbixina, corantes em maior quantidade no urucum, apresentam absorção máxima no UV-Vis em 470 nm e 468 nm, respectivamente (COSTA & CHAVEZ, 2005;). Os espectros obtidos para os extratos de urucum nos dois solventes apresentam pico de absorção máxima em 412 nm. De acordo com a literatura, a posição, intensidade e resolução desses picos de absorção são bastante influenciadas pelo grau de pureza da amostra, pelo solvente usado na extração e pelo ambiente químico no qual a amostra está inserida (SCOTTER, 2009). Alguns autores relataram deslocamentos de algumas dezenas de nanômetros nas posições dos picos de absorção da bixina e norbixina de acordo com o uso de determinados solventes para análise ou para a extração desses compostos (REITH & GIELEN, 1971; COSTA & CHAVEZ, 2005; SILVA, 2007). Além disso, mesmo em amostras que sofreram algum tipo de fracionamento ou purificação é observado deslocamento de sinal e perda de resolução que geralmente é associada à baixa concentração, pureza ou à mistura de isômeros desses carotenoides (REITH & GIELEN, 1971; SANTOS, 2013). Considerando que a amostra foi obtida por extração simples e não passou por nenhum processo de purificação, a presença de outros compostos nas

sementes pode atuar como interferentes provocando o deslocamento observado nos picos de absorção esperado para os corantes presentes no urucum.

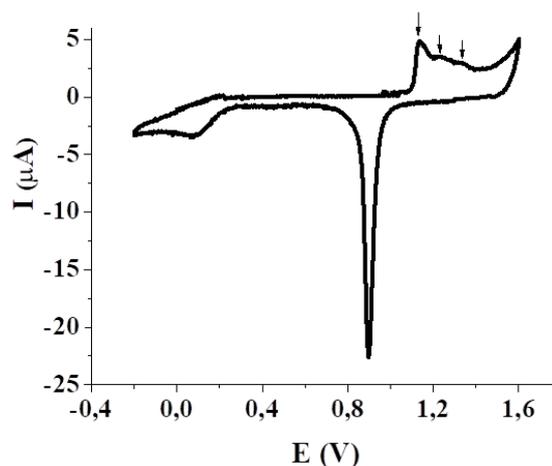
## 5.2 Eletroquímica

### 5.2.1 Tratamento de superfície

#### 5.2.1.1 Eletrodo de ouro

O tratamento da superfície do eletrodo de ouro demonstrado na sessão experimental (4.3.3.3.2) fornece um voltamograma típico da superfície de ouro (fig. 18). A faixa de potencial entre 0,3-1,0 V corresponde à região da dupla camada elétrica; em 1,1 V inicia-se a oxidação do ouro que ocorre através da formação de uma camada de óxido de ouro na superfície do eletrodo policristalino. A formação desta camada óxido ocorre em quatro etapas, sendo as três primeiras relacionadas à formação de AuOH e transferência do primeiro elétron e a quarta etapa relacionada à conversão do hidróxido do metal no seu óxido e promovendo a transferência do segundo elétron (PIELA & WRONA, 1995). Essas transferências de elétrons aparecem como picos na região de oxidação, e, na prática, apenas três dos quatro picos costumam ser observados. A redução da camada de óxido formada ocorre em 0,9 V em uma única etapa quando o sentido da varredura é invertido. A redução observada entre -0,2 e 0,2 V é associada ao oxigênio dissolvido na solução e geralmente desaparece quando a solução é purgada.

**Figura 18 - Voltamograma da superfície de Au em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M (branco) a 50 mV. s<sup>-1</sup> e T = 25°C .**

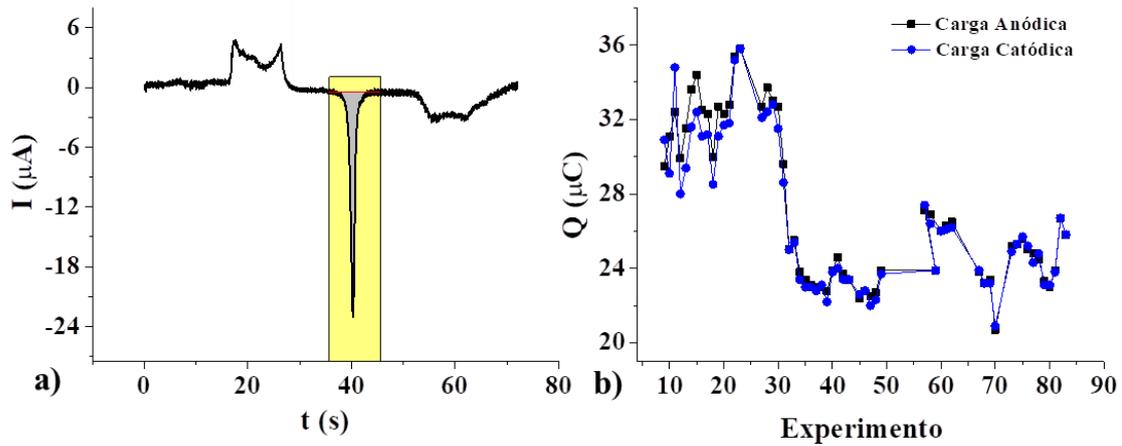


Fonte: A autora (2023).

A ausência de processos faradáicos na região da dupla camada e observação dos três picos de formação da camada de óxido foi usada como parâmetros de limpeza da superfície do eletrodo. A posição do pico de redução do ouro em 0,9 V foi usada como parâmetro de controle de qualidade do eletrodo de referência fabricado, uma vez que, deslocamentos desse potencial indicam problemas de estabilidade do mesmo, seja pela variação da concentração de íons cloreto em seu interior ou pela integridade da camada de AgCl depositada. Durante a realização deste trabalho (2 anos), o eletrodo de referência teve sua camada de AgCl depositada 3 vezes e foi preenchido com solução saturada 4 vezes por motivos de vazamento ou formação de bolhas em seu interior.

Informações sobre a área real da superfície do eletrodo disponível para reações podem ser obtidas através de seus voltamogramas. Em eletrodos de ouro, diferentes métodos são utilizados para obter sua área real, dentre eles, o mais comum inclui técnicas de integração dos picos relacionados à camada de óxido formada em sua superfície. Em um eletrodo sem impurezas, espera-se que as cargas de formação e dissolução das camadas de oxido sejam idênticas. No entanto, dependendo do tratamento utilizado, traços de impurezas remanescentes podem ser oxidados durante o processo de oxidação do ouro, produzindo cargas de oxidação ligeiramente maiores que as cargas de redução e levando a áreas ativas superestimadas (KUBOTA, FREIRE, & CARVALHAL, 2005). Por isso, o pico de redução do óxido de ouro geralmente é utilizado para se obter informações sobre a área real da superfície do eletrodo (fig. 19-a), uma vez que não costuma ter influência de interferentes. A carga desse pico de redução é proporcional à camada de óxido formada e conseqüentemente à área superficial do eletrodo.

**Figura 19 - Cargas do eletrodo de ouro em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M a  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ : a) área de integração e b) variação das cargas com o tratamento de superfície.**



Fonte: A autora (2023).

Espera-se que as cargas anódicas e catódicas em um mesmo voltamograma sejam idênticas, pois devem indicar apenas a formação e redução da camada de óxido na superfície do eletrodo e uma boa correspondência entre esses valores indica que a superfície está livre de impurezas. Isso foi observado neste estudo, com a variação entre as cargas catódicas e anódicas de  $2 \pm 1\%$ , indicando que a superfície está limpa e que o procedimento de limpeza adotado pode ser considerado eficiente. No entanto, foi observada uma alteração nos valores dessas cargas à medida que sucessivos experimentos eram realizados e o eletrodo era continuamente polido. Materiais policristalinos apresentam uma superfície onde a distribuição de átomos difere de lugar para lugar e sua estrutura pode incluir defeitos que ficam mais ou menos aparentes dependendo do tratamento realizado (KUBOTA, et al.; 2005). A variação da superfície à medida que a mesma é continuamente polida/eletropolida pode expor diferentes arranjos da estrutura policristalina que permitem a formação de camadas variáveis de óxido de ouro. A exposição desses novos arranjos da superfície pode alterar a área superficial microscópica do eletrodo, e, com isso, provocar alterações na sua atividade frente a processos redox. Observando que as características da superfície mudam durante a realização deste trabalho, é razoável deduzir que essas mudanças terão efeito na atividade da substância analisada. Assim, como a figura 19-b mostra dois níveis claros de atividade no eletrodo, informações sobre suas áreas efetivas nesses estágios são considerados. É bem descrito na literatura que a carga padrão de redução da camada de óxido para um eletrodo de ouro com

área de  $1 \text{ cm}^2$  é  $390 \pm 10 \text{ } \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  (KUBOTA, et al. 2005; PIELA & WRONA, 1995; BENITES, et al., 2014). Desta forma, a área real do eletrodo ( $A_R$ ) é a razão entre a carga necessária para a redução da camada de óxido do eletrodo em estudo e a carga padrão (GOMES, 2015). Dividindo as atividades da superfície em dois períodos P1 (até o experimento 29) e P2 (após o experimento 29), as áreas reais e os fatores de rugosidades,  $f_R$ , são:

**Tabela 5 - Variação das áreas reais ( $A_R$ ) e dos fatores de rugosidade ( $f_R$ ) do eletrodo de ouro com tempo.**

Período	$Q_{cm}$ ( $\mu\text{C}$ )	* $A_R$ ( $\text{cm}^2$ )	** $f_R$
<b>P1</b>	$31 \pm 2$	$0,08 \pm 0,06$	$4,4 \pm 3,1$
<b>P2</b>	$24 \pm 2$	$0,06 \pm 0,04$	$3,44 \pm 2,4$

\* Calculado através da carga catódica média,  $Q_{cm}$ . \*\* Área geométrica do eletrodo  $A = 0,018 \pm 0,005 \text{ cm}^2$

Fonte: A autora (2023).

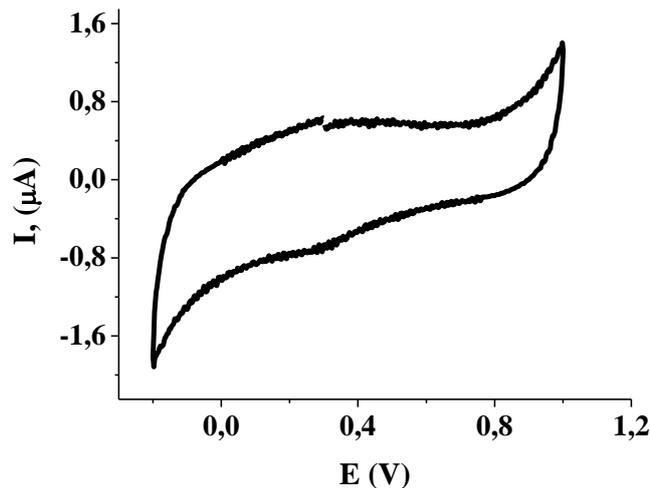
O fator de rugosidade da superfície ( $f_R$ ) é a razão entre a área real e a área geométrica do eletrodo (BENITES, et al., 2014). Os defeitos observados em superfícies altamente rugosas são os responsáveis pelo aumento considerável de suas áreas superficiais. Tratamentos de superfície que incluem técnicas de polimento provocam ranhuras e furos que trazem uma porosidade à superfície fazendo com que a área microscópica seja consideravelmente maior que a geométrica, o que é observado neste trabalho (KUBOTA, et al.; 2005). Desta forma, observa-se que os sucessivos tratamentos dados a este eletrodo alteraram as características dessa superfície e é possível que essa alteração tenha um efeito sobre a atividade eletroquímica de substratos nela analisados.

#### 5.2.1.2 Eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O tratamento da superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi realizado através de uma sequência de polimentos em alumina e banho de ultrassom, como descrito no

procedimento experimental. O voltamograma típico deste eletrodo em meio a ácido é mostrado na figura 20.

Figura 20 - Voltamograma do ECV em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M a  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  e  $T=25^\circ\text{C}$ .



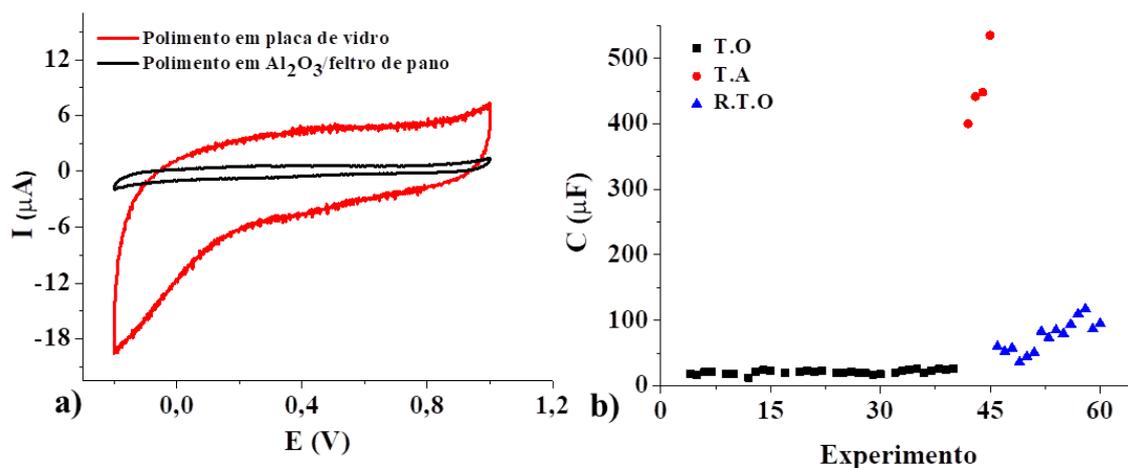
Fonte: A autora (2023).

Um voltamograma de carbono vítreo em meio ácido apresenta um comportamento puramente capacitivo. Pequenas ondas costumam ser observadas entre 0,2-0,6 V e são características de grupos ativos formados na superfície ao longo da varredura e são comumente associados a grupos carbonila e/ou quinonas que ao se formarem ativam sua superfície (VAN DER LINDEN & DIEKER, 1980; PANZER & ELVING, 1975). Uma superfície limpa produz um voltamograma livre de processos faradáicos, e, a capacitância observada (largura do voltamograma) é proporcional à área ativa do eletrodo.

Devido a considerável porosidade desta espécie de carbono, a área real do eletrodo é geralmente maior que sua área geométrica. Além disso, a magnitude dessa porosidade (área real) tem influencia na atividade da superfície frente a espécies eletroativas. Alguns tratamentos de superfície podem ser realizados com o intuito de aumentar a atividade da superfície do eletrodo, e, com isso, melhorar respostas das espécies analisadas. Neste trabalho, o tratamento de superfície descrito por Hu e colaboradores que inclui polimento do eletrodo em placas de vidro foi utilizado como alternativa para aumentar a atividade dos extratos de urucum nesta superfície (HU, KARWEIK & KUWANA, 1985). A realização desse

tratamento gerou um aumento na área do superficial do eletrodo, que no voltamograma foi observado como um aumento considerável na sua carga capacitiva (fig. 21-a). Além disso, o tratamento provocou alterações visuais na superfície do eletrodo que em vez de seu acabamento espelhado típico, assumiu um acabamento fosco/opaco.

**Figura 21 - Tratamento de superfície ECV: a) alteração no voltamograma e b) variação das capacitâncias: tratamento original (T.O), tratamento de ativação (T.A), retorno ao tratamento original (R.T.O).**



Fonte: A autora (2023).

A baixa reprodutibilidade deste pré-tratamento e a observação de que seu uso não alterou significativamente a atividade do extrato (mostrado nas seções seguintes) fez com que essa técnica não fosse adotada e o polimento com alumina/feltro de pano como descrito na seção experimental foi retomado. Antes disso, sucessivos polimentos da superfície (segundo a metodologia original) foram realizados para trazer as capacitâncias dos voltamogramas para valores próximos dos iniciais, além de restaurar o acabamento espelhado da superfície. No retorno ao procedimento original (fig. 21-b), as capacitâncias diminuíram a valores comparáveis aos iniciais (em ordens de grandeza), porém mostraram-se menos reprodutíveis que os observados inicialmente.

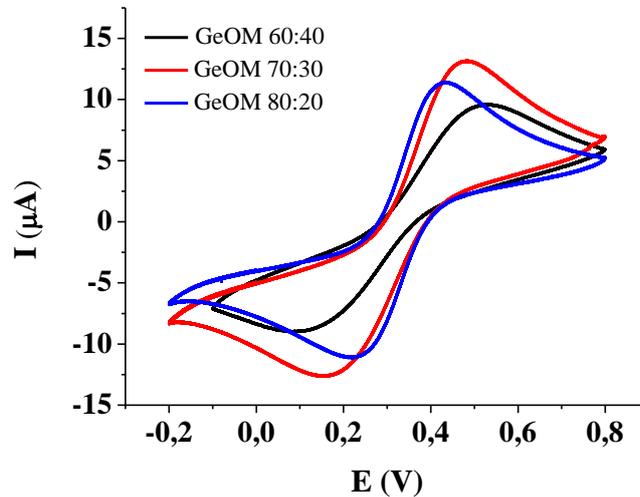
### 5.2.1.3 Eletrodo de pasta de carbono (EPC)

Eletrodos de pasta de carbono são amplamente utilizados como eletrodos de trabalho em pesquisas eletroquímicas. Na literatura, essas pastas são preparadas através da mistura de pó de grafite e um aglutinante, geralmente óleo de silicone ou mineral (parafina líquida/Nujol) sendo esta última a mais utilizada. Alternativamente, um solvente orgânico volátil é utilizado para auxiliar na homogeneização da pasta e é removido da mistura através de sua completa evaporação (ZIMA, et al., 2003; SILVA, 2006; FERREIRA, et al., 2011). Como descrito na seção experimental, a preparação da pasta de carbono foi realizada através da mistura de pó de grafite e parafina líquida em diferentes proporções (m/m). O óleo mineral comercial foi utilizado na preparação das pastas, no entanto, a presença de impurezas que pudessem interferir na qualidade das análises não foi observada. O clorofórmio foi adicionado à mistura com o objetivo de auxiliar na homogeneização da pasta.

Embora a grafite seja conhecida por apresentar boa condutividade, a presença do óleo mineral adiciona certa resistência elétrica ao eletrodo. Assim, diferentes proporções dos componentes dessa pasta são apresentadas na literatura e cabe ao pesquisador avaliar qual proporção é mais adequada para o seu sistema (PALLESCHI, et al., 2003). Neste trabalho, algumas proporções de pó de grafite e óleo mineral (m/m) foram avaliadas considerando seu desempenho em uma sonda eletroquímica como o ferro/ferricianeto de potássio. O sistema ferri/ferro apresenta um comportamento reversível quando em solução e esse comportamento amplamente conhecido foi utilizado para avaliar a condutividade das pastas através de sua resistência (ou não) à transferência de elétrons desse par redox.

As pastas de carbono foram preparadas nas proporções grafite/óleo mineral 60:40, 70:30 e 80:20 (m/m) e seus desempenhos em soluções de ferro/ferricianeto de potássio 1 mM em KCl estão dispostas na figura 22:

**Figura 22 - Voltamogramas do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  1 mM em KCl 0,1 M em eletrodos de pasta de carbono em diferentes proporções (m/m) de grafite e óleo mineral.  $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$  e  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .**



A resistência conferida à pasta pelo óleo mineral foi facilmente observada nos voltamogramas do ferri/ferrocianeto em KCl através das separações de pico de suas reações de oxidação e redução. A presença de óleo mineral em maior quantidade proporcionou uma separação de pico em torno de 435 mV, um valor exorbitantemente maior do valor esperado de 60 mV para sua reação reversível (BARD & FAULKNER, 1980). Embora diminuir a quantidade de óleo na pasta tenha diminuído essa separação para menos da metade do valor inicial, este ainda está bem distante dos parâmetros ideais. Voltamogramas altamente resistivos para a transferência de elétrons do ferri/ferrocianeto em EPC's também foram observados por Zamarck que associou à resistência da pasta de carbono a diminuição da taxa de transferência de elétrons do par redox (ZAMARCHI, 2019). Uma pasta com a proporção 90:10 (m/m) foi preparada, mas a baixíssima quantidade de óleo presente prejudicou a integridade da mesma tornando-a seca, quebradiça e de difícil compactação. Como o intuito desta investigação é apenas encontrar a proporção da pasta que fornece menor resistência e mantém sua integridade, a proporção grafite/óleo mineral de 80:20 foi escolhida para realizar a avaliação eletroquímica do extrato.

### 5.3 Avaliação eletroquímica do urucum

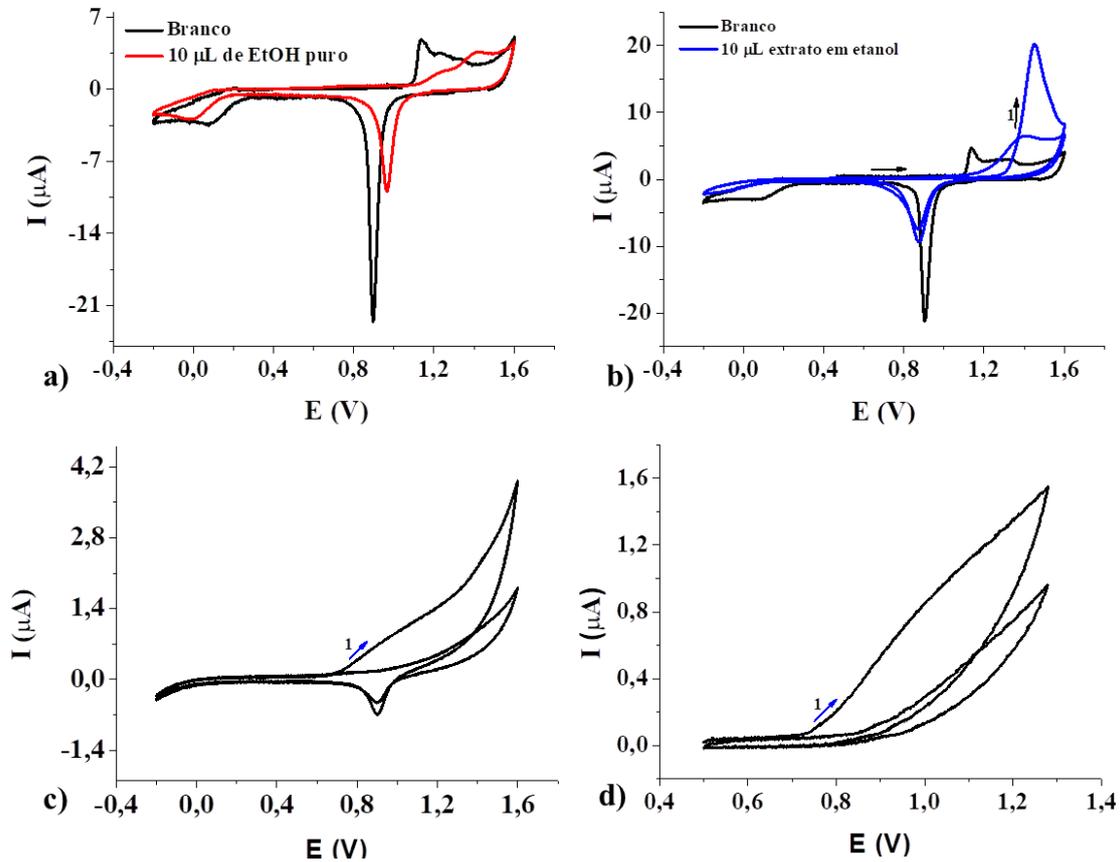
As análises voltamétricas do urucum foram realizadas através da técnica “drop casting” que consiste em depositar o analito dissolvido em um solvente volátil na superfície do eletrodo e analisar eletroquimicamente o filme formado após sua evaporação (GAO, et al., 2021; PAVINATTO, et al., 2022). Os extratos foram depositados na superfície dos eletrodos de ouro, carbono vítreo e pasta de carbono.

#### 5.3.1 Eletrodo de ouro

A adição dos extratos de urucum à superfície do eletrodo produz um filme de coloração laranja que é insolúvel em água e só é removido através de procedimentos de limpeza. O extrato de urucum em etanol foi o primeiro a ser avaliado eletroquimicamente e os perfis inicialmente obtidos são mostrados na figura 23.

É bem conhecido na literatura que o etanol apresenta atividade eletroquímica no eletrodo de ouro (TREMILIOSI-FILHO, et al., 1998; LAI, et al., 2010; ABREU, 2012). Um volume de etanol puro foi evaporado na superfície do eletrodo e o perfil eletroquímico foi registrado para verificar a atividade de possíveis resíduos do solvente e podê-las distinguir do perfil do extrato (fig. 23-a). A evaporação do solvente na superfície bloqueia a atividade do ouro, que pode ser notado pela diminuição nas intensidades das correntes de formação e dissolução do óxido do metal e através do deslocamento dos seus potenciais de oxidação e redução para valores mais positivos. Além disso, a carga anódica no eletrodo com o solvente evaporado é ligeiramente maior que a carga catódica indicando a presença de resíduos eletroativos na superfície.

**Figura 23 - Voltamogramas dos filmes depositados (10  $\mu\text{L}$ ) de: a) etanol puro (1 $^\circ$  ciclo), b) extrato em EtOH antes da alteração da superfície (P1), c) extrato em EtOH depois da alteração da superfície (P2) e d) perfil do extrato (P2) com a janela de potencial ajustada. Superfície de ouro em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .**



Fonte: A autora (2023).

Como citado na seção 5.2.1.1, o tratamento dado à superfície do eletrodo de ouro alterou suas características à medida que sucessivos experimentos eram realizados. Essa alteração modificou a atividade eletroquímica do extrato nesta superfície, e, consequentemente modificou o perfil voltamétrico observado. Inicialmente, o perfil do filme de extrato de urucum em etanol formado na superfície apresentava um intenso pico de oxidação 1,3 V (fig. 23-b) durante o primeiro ciclo da varredura. Em ciclos posteriores, uma redução da intensidade da corrente de oxidação era observada, e, esta corrente tendia a ficar constante à medida que sucessivos ciclos eram realizados. Em todos os ciclos, um pico de redução próximo a 0,9 V é observado; como esse pico é associado à redução do óxido de ouro, sua presença indica que a corrente anódica (no primeiro ciclo) possui contribuições de oxidação do extrato e do ouro sendo este reduzido quando a varredura tem seu sentido

invertido. A intensidade do pico catódico quase não se altera entre primeiro e o segundo ciclo. Além disso, as cargas catódicas e anódicas a partir do segundo ciclo são similares e indicam que a corrente anódica após o primeiro ciclo é relativa à oxidação do ouro e todo o extrato é oxidado na primeira varredura.

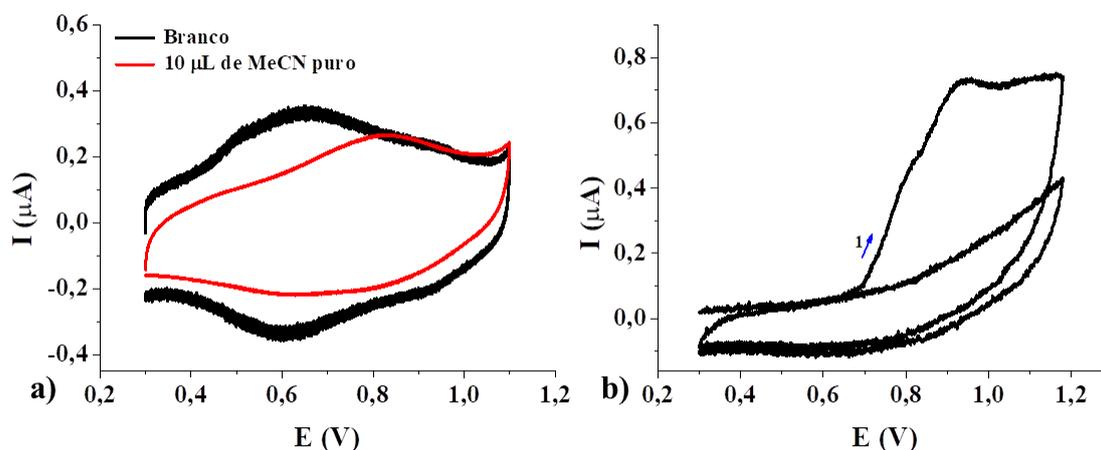
Com a mudança nas características da superfície do eletrodo de ouro, a atividade do extrato em etanol diminuiu consideravelmente. Diversos experimentos (não mostrados) para verificar se esta alteração estava associada ao procedimento experimental (contaminação de vidrarias e reagentes, influência do ambiente) ou ao extrato (extração, solvente, lote de sementes) foram realizados e todas as rotas produziram voltamogramas semelhantes ao da figura 23-c. Uma corrente anódica é observada no primeiro ciclo e diminui drasticamente nos demais. A presença de um pequeno pico de redução indicava que o ouro ainda estava sendo oxidado, embora em menor quantidade. No entanto, a magnitude dessas correntes é quase cinco vezes menor que as observadas inicialmente. Este comportamento pode estar associado, à mudança nas características da superfície do eletrodo descritas na sessão de tratamento de superfície. Nas condições experimentais adotadas, é possível que o ouro e os defeitos de sua superfície tenham um papel importante como catalisador da oxidação do extrato de urucum, e, à medida que a área superficial do eletrodo é alterada, sua atividade catalisadora também é. O perfil inicial para o extrato não foi obtido novamente, assim como as condições de superfície (rugosidade) anteriores não foram observadas, o que colabora com a teoria de que a atividade do extrato de urucum está intimamente relacionada ao estado da superfície do eletrodo de ouro.

Embora a mudança do perfil do extrato tenha proporcionado uma perda de resolução de sinal com a mudança de um pico bem definido para uma onda de oxidação, também é possível notar que a oxidação do extrato passou a ocorrer na região da dupla camada elétrica iniciando sua oxidação em 0,736 V. O intervalo de varredura foi diminuído para que a contribuição da oxidação do ouro (observada no pico de redução durante a varredura inversa) fosse removida (fig.23-d). Com isso, toda a corrente de oxidação observada é exclusivamente do extrato depositado. Esse perfil voltamétrico indica que o extrato de urucum depositado na superfície do eletrodo é oxidado irreversivelmente, à medida que sucessivos ciclos são realizados toda a substância é oxidada e o produto dessa oxidação é eletroquimicamente inativo e isola a superfície do eletrodo dificultando a passagem de elétrons.

O extrato em MeCN foi avaliado em condições semelhantes. Informações sobre a influência da superfície na sua atividade não foram obtidas, pois, o extrato foi avaliado no

período em que a modificação da superfície já havia sido observada (período P2). O perfil voltamétrico do extrato é mostrado na figura 24:

**Figura 24 - Voltamogramas dos filmes em superfície de ouro em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ : a) 10  $\mu\text{L}$  de acetonitrila puro (1º ciclo) e b) 10  $\mu\text{L}$  de extrato em acetonitrila.**



Fonte: A autora (2023).

A adição de solvente puro à superfície do eletrodo foi realizada com o intuito de diferencia-lo do perfil do extrato. Apenas uma diminuição da corrente capacitiva foi observada, possivelmente por um bloqueio causado por espécies remanescentes (fig. 24-a). A oxidação do extrato teve seu início em 0,678 V (fig. 24-b). De forma semelhante ao observado para o extrato em etanol, uma oxidação intensa ocorre no primeiro ciclo e um perfil de bloqueio é observado nos demais. No entanto, algumas diferenças podem ser notadas: durante a oxidação a curva apresenta umas ondulações que não são observadas no perfil do extrato em etanol; essas ondulações podem indicar diferentes etapas no processo de oxidação do extrato nessas condições. A partir de 0,9 V a corrente de oxidação deixa de aumentar proporcionalmente ao potencial e atinge um patamar como uma espécie de “corrente limite” um comportamento que costuma estar associado a transformações eletroquímicas afetadas por transporte de massa. Embora não seja um perfil típico de espécies adsorvidas em superfície onde apenas processos de transferência de carga são esperados, o voltamograma sugere que a oxidação do extrato nessas condições possui características de estado estacionário. Além disso, as correntes de oxidação do extrato em acetonitrila são quase a metade das observadas

para o extrato em etanol, indicando que o extrato obtido nessas condições apresenta uma menor atividade eletroquímica nesta superfície.

Perfis voltamétricos semelhantes aos descritos até aqui foram observados por Banica e colaboradores (2002) em eletrodos de ouro modificados com camadas automontadas de  $\beta$ -caroteno funcionalizado. Neste trabalho, os sinais do substrato oxidando juntamente com a oxidação do ouro e sozinho na dupla camada são observados simultaneamente durante obtenção do voltamograma cíclico. Para o primeiro sinal, uma oxidação intensa no primeiro ciclo seguido de uma diminuição nos demais é observada juntamente com o pico de redução do ouro. No segundo sinal, uma oxidação irreversível é observada no primeiro ciclo e a corrente de oxidação atinge uma “corrente limite” semelhante ao observado neste trabalho. Os autores consideram esta oxidação característica de carotenoides com substituintes oxigenados (BANICA, et.al, 2002).

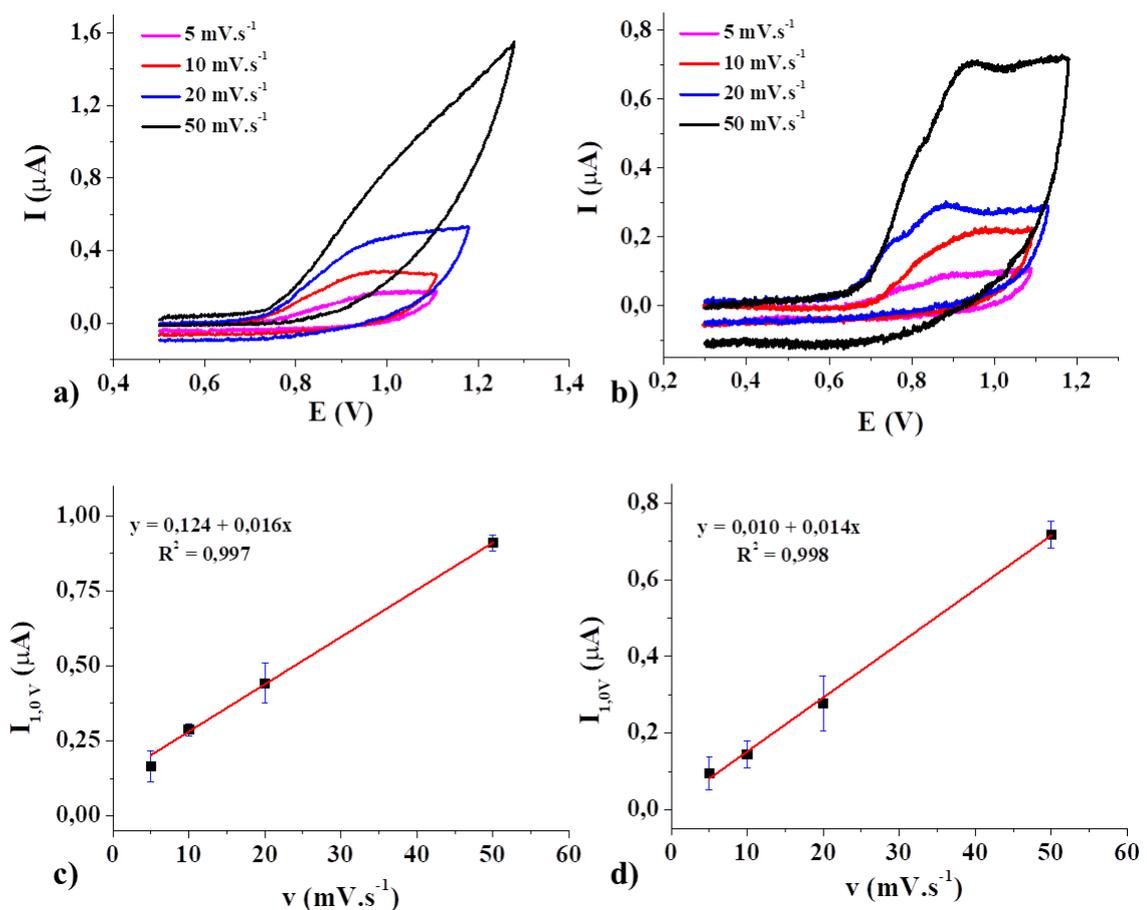
Tentativas de variar a concentração do extrato na superfície através da deposição de volumes variados de extrato não apresentaram resultados satisfatórios. As medidas realizadas desta forma mostraram-se irreprodutíveis, e, esta irreprodutibilidade está relacionada a limitações da técnica de deposição (COMPTON, et al, 2020). Ao adicionar volumes diferentes, o espalhamento do extrato não fica contido na superfície do eletrodo e, desta forma, quantidades diferentes de substância ficam retidas na superfície ativa em cada repetição. Por outro lado, adicionar sucessivas camadas de extrato, faz com que o solvente de cada nova camada dissolva a anterior proporcionando padrões diferentes de cobertura da superfície, e com isso, afetando a reprodutibilidade dos experimentos. A irreprodutibilidade observada é uma das limitações da técnica de drop-casting e costuma estar associada aos padrões de espalhamento e secagem da substância depositada além da interação do solvente com a superfície (TORRES, SOARES, & PAVINATTO, 2022).

#### *5.3.1.1 Variação da velocidade de varredura.*

A velocidade de varredura é um dos parâmetros que podem ser alterados para avaliar o comportamento do extrato em superfície. A figura 25 mostra o efeito desta variação nos voltamogramas dos extratos em etanol e acetonitrila. É possível observar um aumento nas correntes de oxidação do extrato à medida que a velocidade de varredura aumenta. Para o extrato de urucum em etanol, observa-se uma diferença no formato das curvas ao sair da

velocidade de varredura mais baixa para a mais alta. Enquanto na primeira as curvas parecem atingir um patamar no valor da corrente, a partir de  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  esse perfil não é mais observado e isso pode ser um indicativo de que há alterações na transferência de elétrons da substância conforme a velocidade de varredura é alterada (fig.25-a). Para o extrato em MeCN (fig.25-b), a corrente com um comportamento de “corrente limite” é observado em todas as velocidades de varredura, as correntes também aumentam com a velocidade e ondulações no início da curva são observadas a medida que o voltamograma é registrado, diferente do observado para o extrato em EtOH.

**Figura 25 - Efeito da velocidade de varredura no voltamograma e na corrente de oxidação do filme do extrato ( $10 \mu\text{L}$ ) na superfície do eletrodo de ouro em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ M}$  ( $1^\circ$  Ciclo): (a) e (c) em EtOH e (b) e (d) em MeCN (b) e (d).**



Fonte: A autora (2023).

Um dos parâmetros mais avaliados nos voltamogramas para obter informações sobre o analito é a corrente de pico,  $I_p$ , a corrente máxima observada durante a oxidação/redução de uma determinada substância. Embora um aumento nas correntes seja observado com a variação da velocidade de varredura, uma corrente de pico não pode ser obtida uma vez que a oxidação do extrato não exibe o perfil de um pico, e, sim, uma onda de oxidação. Perfis semelhantes são observados em de substâncias naturais avaliadas eletroquimicamente e que possuem oxidação irreversível (DOMÉNECH-CARBÓ & DOMÍNGUEZ, 2015; CIZMEK & KOMORSKY-LOVRIC, 2019). No entanto, a corrente de oxidação desse extrato pode ser avaliada através da variação da corrente de oxidação com a velocidade de varredura a um potencial fixo. Assim, fixando o potencial em um valor onde a oxidação já está avançada e razoavelmente antes do ponto de retorno da varredura (fig. 25- a e b), a variação da corrente de oxidação dos extratos com a velocidade de varredura pode ser obtida. Adotando esse procedimento e fixando o potencial em 1,0 V, observou-se uma dependência linear entre as correntes de oxidação e a velocidade de varredura para o extrato em EtOH (fig. 25-c) e para o extrato em MeCN (fig. 25-d). Esse é um comportamento esperado para espécies adsorvidas na superfície, como é o caso dos filmes analisados neste trabalho.

O potencial no qual inicia a oxidação dos extratos ( $E_{ox}$ ) é estimado através do ponto de intercessão das retas traçadas: uma na linha de base do voltamograma e outra na linha de oxidação do extrato. O potencial de oxidação nessa superfície não apresenta uma tendência clara à medida que a velocidade de varredura é alterada. Para ambos os extratos, costuma ter valores menores para as velocidades mais baixas e aumentar ligeiramente para as velocidades mais altas, indicando que em velocidades mais altas, a barreira energética para a oxidação do extrato é maior e o processo tende a ser mais irreversível.

**Tabela 6 - Variação do potencial de oxidação ( $E_{ox}$ ) dos extratos com a velocidade de varredura em eletrodo de Au.**

<b>Velocidade (<math>mV.s^{-1}</math>)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>50</b>
<b>Extrato</b>				
EtOH	$0,70 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,01$	$0,74 \pm 0,01$

MeCN	$0,65 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,01$
------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

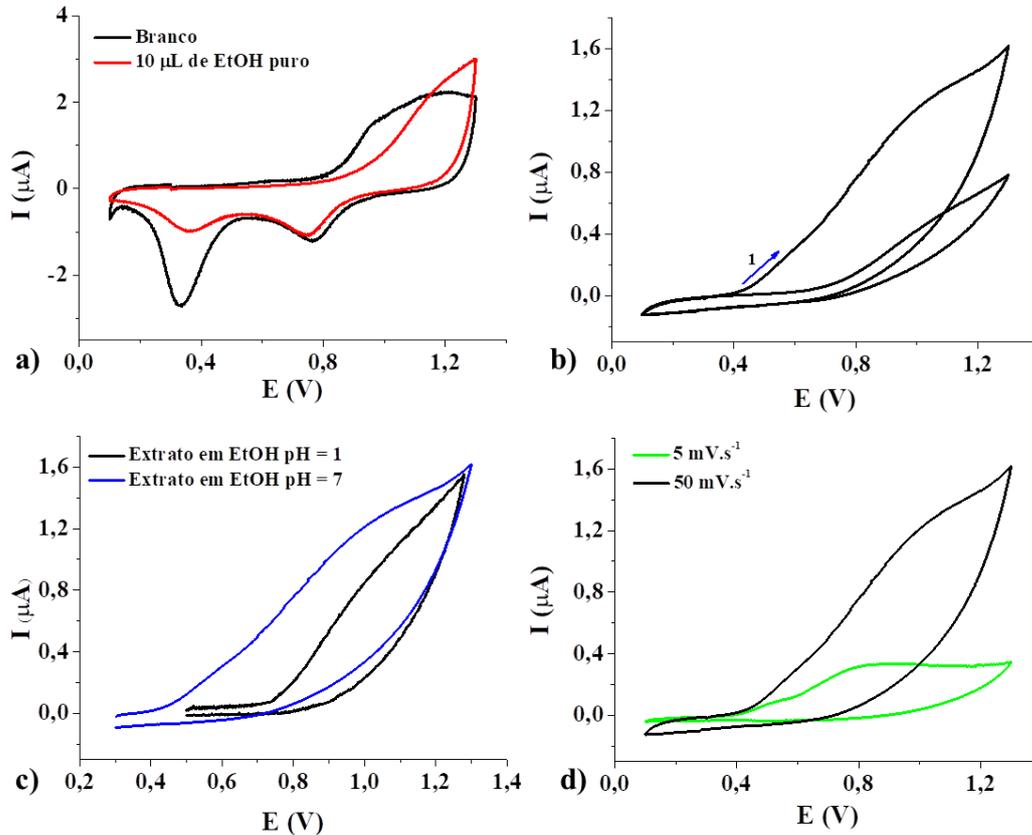
Fonte: A autora (2023).

### 5.3.1.2 *Variação do eletrólito*

A avaliação do extrato em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1M (pH=7) foi realizada com o intuito de verificar a interação do extrato com o meio e sua influência na forma como o mesmo oxida. A oxidação do ouro em meio neutro é representado na figura 26-a através de seu voltamograma típico: a oxidação do ouro em 0,8 V e sua redução na varredura inversa em duas etapas em (SRINIVASAN, SAIBI, & MEETHAL, 2022). A evaporação de etanol puro na superfície provocou uma alteração no potencial de oxidação do ouro e em suas correntes de oxidação e redução, indicando um bloqueio de superfície, no entanto, ambos os perfis são facilmente distinguíveis da oxidação do extrato nessas condições.

A oxidação do extrato nesta superfície resulta em um perfil semelhante ao observado para o extrato em meio ácido: uma onda de oxidação intensa no primeiro ciclo que tem sua intensidade consideravelmente reduzida nos ciclos seguintes (fig. 26-b). No entanto, uma comparação dos voltamogramas dos extratos em ambos os meios (fig.26-c) permite notar que enquanto a oxidação do extrato em meio ácido tem seu início em 0,745 V, em meio neutro essa oxidação inicia em 0,445 V, uma diferença de 300 mV. Além disso, maiores correntes de oxidação são observadas em meio neutro. O aumento das correntes de oxidação do extrato em conjunto com a diminuição do potencial de oxidação, indica que a atividade eletroquímica do extrato de urucum nessas condições é facilitada.

**Figura 26 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Au em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1M (pH = 7): a) branco e 10  $\mu\text{L}$  de EtOH evaporado na superfície (1° ciclo), b) filme do extrato em EtOH (10 $\mu\text{L}$ ), c) Comparação meio neutro e ácido (1° ciclo) e d) efeito da velocidade de varredura (1° ciclo).**



Fonte: A autora (2023).

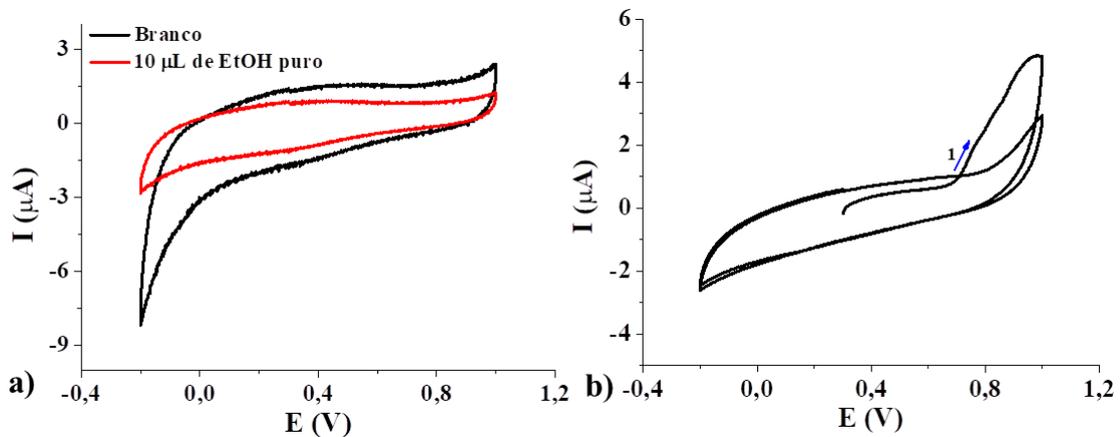
De forma semelhante ao observado em meio ácido, diminuir a velocidade de varredura tem um efeito significativo sobre o formato do voltamograma do extrato (fig.26-d). Em velocidades mais baixas, a corrente de oxidação tende a atingir um patamar, uma “corrente limite”, além disso, pequenas ondulações durante o início da oxidação são mais perceptíveis quando o experimento é realizado a baixa velocidade.

### 5.3.2 Eletrodo de carbono vítreo (ECV)

Os filmes de extratos de urucum também foram avaliados em eletrodo de carbono vítreo. A evaporação de etanol puro na superfície (fig. 27-a) teve apenas um efeito de diminuição da carga capacitiva do eletrodo, possivelmente por bloqueio de sua superfície, de

forma semelhante ao observado na superfície do ouro. Com a adição de extrato à superfície (fig. 27-b), uma oxidação irreversível foi observada iniciando em 0,70 V e essa oxidação ocorre apenas no primeiro ciclo e um perfil capacitivo é observado nos demais. O filme depositado na superfície permanece visível ao fim dos experimentos, indicando que o produto gerado após a oxidação do extrato permanece na superfície, porém é eletroquimicamente inativo.

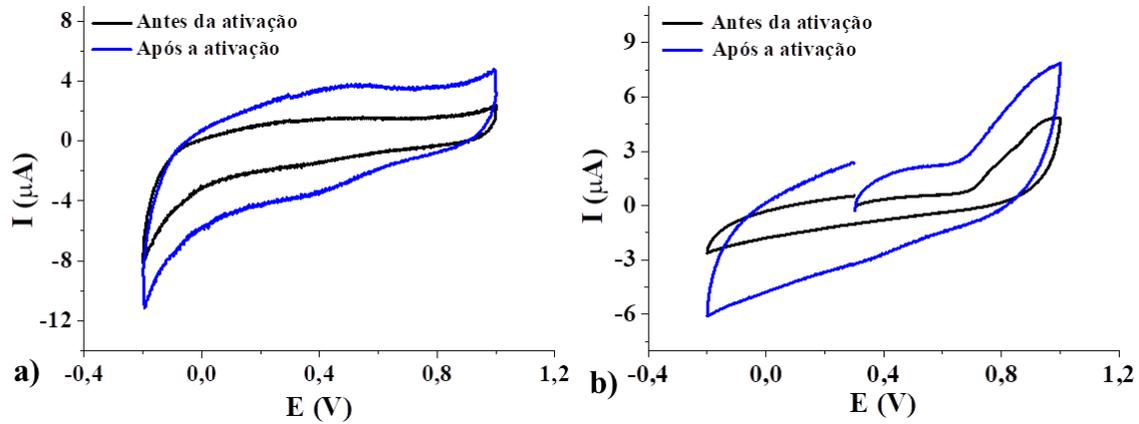
**Figura 27 - Voltamogramas do ECV em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $T= 25 \text{ }^\circ\text{C}$ : a) 10  $\mu\text{L}$  de EtOH puro (1º ciclo) e b) 10  $\mu\text{L}$  de extrato em EtOH evaporados na superfície.**



Fonte: A autora (2023).

Como mencionado na seção 5.2.1.2, um tratamento de superfície foi dado ao eletrodo de carbono vítreo na tentativa de melhorar a atividade eletroquímica observada para o extrato. O procedimento adotado, apesar de aumentar significativamente a área superficial do eletrodo, não se mostrou satisfatório em termos de reprodutibilidade e atividade do extrato. Mesmo retornando ao tratamento de superfície original, a mudança provocada na superfície não foi totalmente revertida e a carga capacitiva do eletrodo permaneceu maior que a observada anteriormente (fig. 28-a) embora sua reprodutibilidade estivesse satisfatória. As principais alterações do tratamento de superfície no perfil do extrato foram o aumento da corrente de fundo (capacitiva) e uma diminuição da resolução da onda de oxidação do extrato onde as pequenas ondulações presentes no voltamograma deixaram de ser observadas (fig. 28-b).

**Figura 28 – Voltamogramas do ECV em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  após o retorno ao tratamento de superfície original (1º ciclo): a) branco e b) 10  $\mu\text{L}$  do extrato em EtOH evaporado na superfície .**



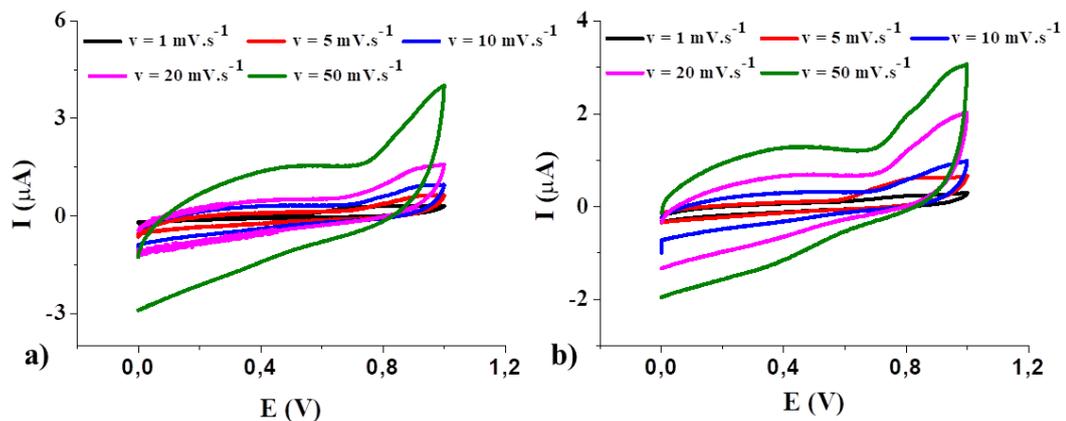
Fonte: A autora (2023).

Tentativas de variar a concentração do extrato na superfície não foram bem sucedidas, pois assim como na superfície do ouro, a formação do filme do extrato na superfície apresenta os mesmos problemas de reprodutibilidade proporcionados pela técnica de evaporação.

### 5.3.2.1 Efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura sobre o voltamograma dos extratos em etanol e acetonitrila é mostrado na figura 29.

**Figura 29 - Efeito da velocidade de varredura no voltamograma do filme do extrato (10 $\mu\text{L}$ ): (a) em EtOH e (b) em MeCN**



Fonte: A autora (2023)

É possível observar um aumento nas correntes de oxidação dos extratos à medida que a velocidade de varredura aumenta, esse aumento como observado para o eletrodo de ouro, é linear e característico de espécies confinadas na superfície. A tendência das correntes de atingirem um patamar é novamente observada para as velocidades mais baixas (até  $10 \text{ mV.s}^{-1}$  para o extrato em EtOH e  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  para o extrato em MeCN), indicando que o mecanismo de oxidação do extrato nesta superfície também possui características de estado estacionário a baixas velocidades de varredura.

O potencial de oxidação dos extratos é afetado ligeiramente à medida que a velocidade de varredura é alterada e tendem a aumentar com o aumento da velocidade de varredura (Tab.7), de forma similar ao observado na superfície do eletrodo de ouro indica um aumento na irreversibilidade do processo de oxidação do extrato.

**Tabela 7 - Variação do potencial de oxidação ( $E_{ox}$ ) dos extratos com a velocidade de varredura em ECV.**

<b>Velocidade (<math>\text{mV.s}^{-1}</math>)</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>50</b>
<b>Extrato</b>					
EtOH	$0,55 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,01$
MeCN	$0,58 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,01$

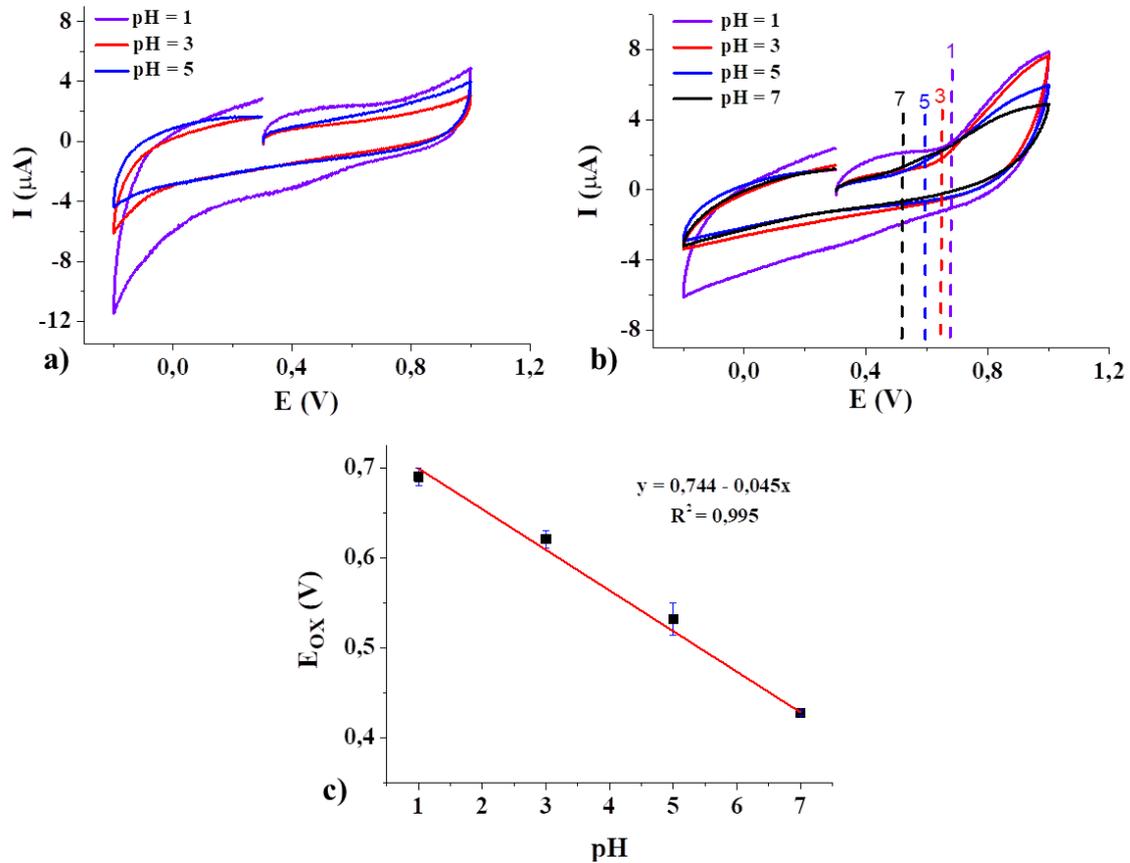
Fonte: A autora (2023).

### 5.3.2.2 Efeito do pH

Como os extratos em etanol e acetonitrila apresentam perfis voltamétricos semelhantes, apenas o primeiro foi avaliado quanto a influência do pH. Iniciando pelo branco (fig. 30-a), o aumento do pH mostrou influenciar a capacitância do voltamograma do ECV diminuindo seu valor.

Figura 30 - Efeito da variação pH no voltamograma do ECV a) do branco, b) filme de extrato em EtOH (10 $\mu$ L), c) no potencial de oxidação. Ph = 1 a 5  $\rightarrow$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH = 7  $\rightarrow$  Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, v = 50 mV.s<sup>-1</sup> e

T = 25°C



Fonte: A autora (2023).

Para o extrato (fig. 30-b), aumentar o pH provocou uma alteração nos valores observados para as correntes e potenciais de oxidação que tendem a diminuir com o aumento do pH. Os potenciais de oxidação são deslocados para valores menores à medida que o pH da solução é continuamente aumentado. O fato do potencial de oxidação ser alterado com o aumento do pH, impossibilita a avaliação da corrente de oxidação a potencial fixo adotada neste trabalho.

A variação do potencial de oxidação com o pH segue um comportamento linear (fig.30-c). A equação que descreve a dependência dos potenciais de oxidação do extrato de urucum em EtOH com a variação do pH é:

$$E_{\text{ox}} = 0,744 - 0,045\text{pH}$$

Considerando a relação entre a variação do potencial e o pH dada pela equação de Nernst (BRETT & BRETT, 1993; WOLYNEC, 2013):

$$E = E^0 - \frac{2,303RT}{nF} \text{pH} \quad (4)$$

A inclinação da reta fornece a relação entre prótons e elétrons transferidos por unidade de pH. A inclinação de  $45 \text{ mV.pH}^{-1}$  para dependência do potencial de oxidação com o pH proporciona um  $n = 1,3$  e sugere um mecanismo oxidação com uma relação unitária entre prótons e elétrons (SMITH, 2006; OLIVEIRA-BRETT, et.al, 2004; MOUCHREK-FILHO, CHIERICE, & MARQUES, 1999). Além disso, o coeficiente linear da equação 4 fornece o potencial padrão do eletrodo que para o extrato de urucum na superfície do eletrodo de carbono vítreo é  $E^0 = 0,744\text{V}$ .

Embora a diminuição do potencial de oxidação com aumento do pH indique uma maior facilidade de oxidação do extrato na superfície do eletrodo, a diminuição da definição da onda e das correntes de oxidação mostram que a oxidação do extrato é influenciada pela presença de íons  $\text{H}^+$ , indicando que estes assumem um papel importante no mecanismo de oxidação do mesmo. Desta forma, a escolha do pH trabalhável deve ser realizada de acordo com o parâmetro desejado em cada análise (AZEVEDO, 2014;).

### 5.3.3 Eletrodo de pasta de carbono (EPC)

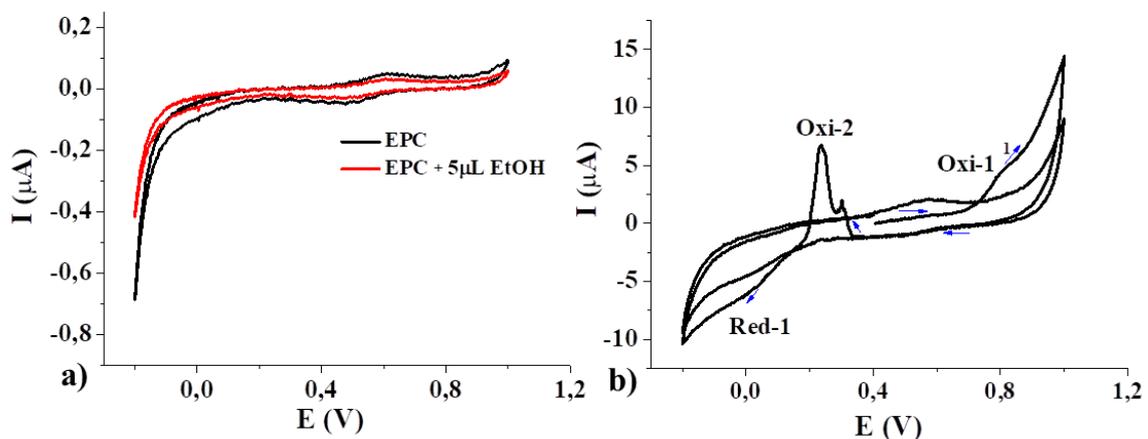
O eletrodo de pasta de carbono foi uma das superfícies utilizadas para avaliar o perfil do extrato de urucum em etanol. De forma semelhante aos eletrodos anteriores, volumes de extrato foram adicionados na superfície e avaliados eletroquimicamente após a completa secagem. No entanto, diferente dos eletrodos anteriores o filme após secagem não é observado, isso se deve ao fato de que o extrato adicionado penetra na cavidade do eletrodo e mistura-se à pasta durante sua evaporação.

Como comentado na seção 5.2.1.3, a presença do óleo mineral no EPC introduz certa resistência à pasta que pode ser vista através de uma diminuição considerável das correntes capacitivas características de eletrodos de carbono. A adição de etanol puro a esse eletrodo

não mostrou o surgimento de atividade eletroquímica e atuou apenas reduzindo ligeiramente sua capacitância (fig. 31-a).

A voltametria do EPC com extrato de urucum em etanol mostra um perfil eletroquímico diferente do observado para os eletrodos anteriores. Durante a varredura, nota-se o surgimento de três sinais eletroquímicos: duas oxidações e uma redução (fig.31-b). A primeira oxidação (Oxi-1) inicia em 0,708V, essa onda ocorre na mesma região e possui formato e comportamento semelhante ao observado para os eletrodos de carbono vítreo e Au, com uma oxidação intensa no primeiro ciclo que desaparece nos demais. A segunda oxidação (Oxi-2) tem seu início em 0,340 V e seu sinal ocorre na forma de um pico duplo com intensidades diferentes, esse sinal também é observado apenas no primeiro ciclo da varredura. O terceiro sinal, a redução (Red-1), inicia em 0,190 V e mostra-se como uma onda que diminui de intensidade à medida que vários ciclos são realizados.

**Figura 31 - Voltamograma do EPC em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M a  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ : a) evaporação de  $5\mu\text{L}$  de EtOH puro e b) evaporação de  $5\mu\text{L}$  do extrato em EtOH na superfície.**

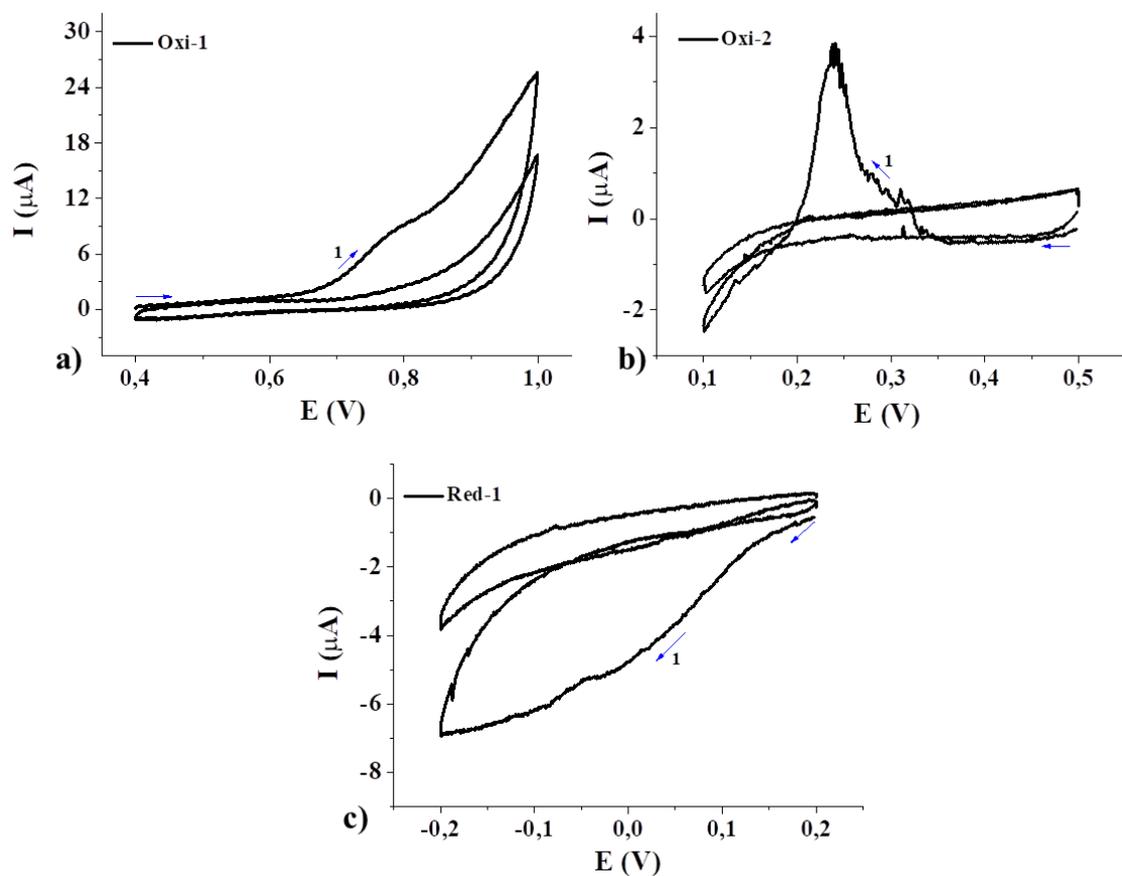


Fonte: A autora (2023).

Embora o extrato usado nos experimentos com EPC seja o mesmo utilizado para os eletrodos de carbono vítreo e ouro, mais sinais eletroquímicos são observados no EPC. Isso pode se dar ao fato de que embora o extrato seja evaporado na superfície de todos os eletrodos, no EPC, ele penetra na cavidade do eletrodo adentrando na pasta e se misturando a ela. Isso pode garantir certa estabilidade aos componentes eletroativos presentes no extrato e facilitar a transferência de elétrons dos mesmos.

Ao verificar a existência desses três sinais no voltamograma, o primeiro questionamento é se os sinais possuem relação um com o outro. Para avaliar essa possibilidade, varreduras nos trechos em que esses sinais aparecem foram realizadas para verificar se as atividades eletroquímicas são independentes umas das outras ou estão interligadas. Na figura 32, é possível observar que os três sinais eletroquímicos aparecem em suas respectivas regiões mesmo que a varredura não passe pelas regiões dos demais sinais, indicando serem respostas eletroquímicas de substâncias diferentes presentes no urucum.

**Figura 32 - Voltamograma dos sinais do extrato de urucum em EtOH (5  $\mu$ L) no EPC em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M a 20 mV.s<sup>-1</sup>: a) oxidação 1 e b) Oxidação 2 e c) redução 1.**



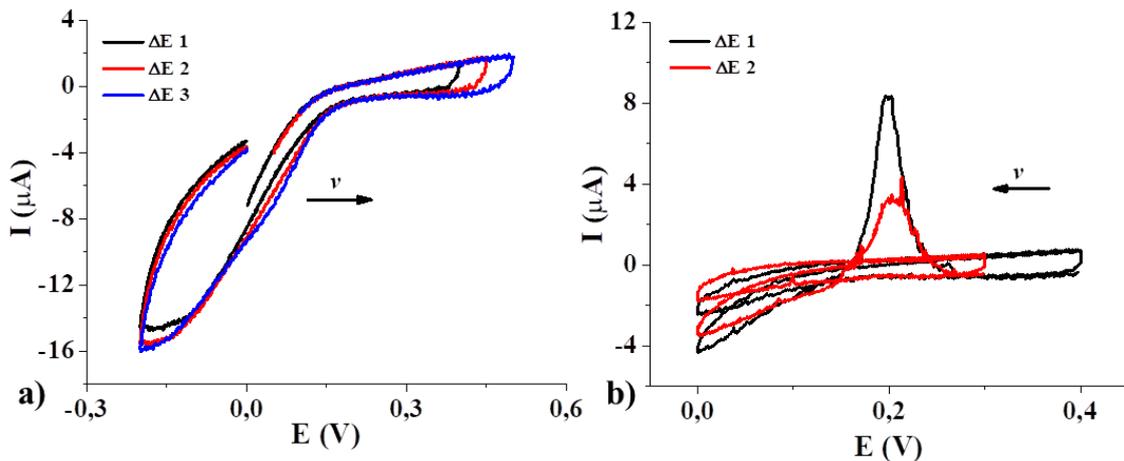
Fonte: A autora (2023).

Avaliando cada sinal separadamente algumas características puderam ser notadas: os sinais de oxidação (fig. 32-a e b) são dependentes do sentido de varredura, a primeira oxidação (Oxi-1) só é observada ao fazer a varredura no sentido anódico e a segunda oxidação só é observada quando a varredura é realizada no sentido catódico. A redução (fig.32-c) é

observada independente da direção de varredura realizada, no entanto, sua reprodutibilidade é maior quando o sentido catódico é adotado.

Para investigar a natureza do sinal eletroquímico Oxi-2 cujo comportamento peculiar mostra um processo de oxidação enquanto uma varredura catódica é realizada, alguns experimentos foram realizados para verificar o efeito do intervalo de potencial,  $\Delta E$ , sobre do pico Oxi-2. Como mencionado anteriormente e mostrado na figura 33, este sinal eletroquímico é observado apenas em varreduras realizadas no sentido catódico e é independente do potencial no qual se inicia essa varredura (fig. 33-b). A influência do potencial de início sobre a diminuição observada na intensidade da corrente de oxidação dessa espécie não foi avaliada, porém o mais provável é que essa diferença seja causada por uma falha de reprodutibilidade durante a realização desses experimentos.

**Figura 33 - Efeito do intervalo de potencial ( $\Delta E$ ) e direção da varredura na observação do pico da espécie eletroativa Oxi-2: a) sentido anódico e b) sentido catódico no EPC com 5  $\mu\text{L}$  de extrato de urucum em EtOH em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M a  $20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (1<sup>o</sup> ciclo).**



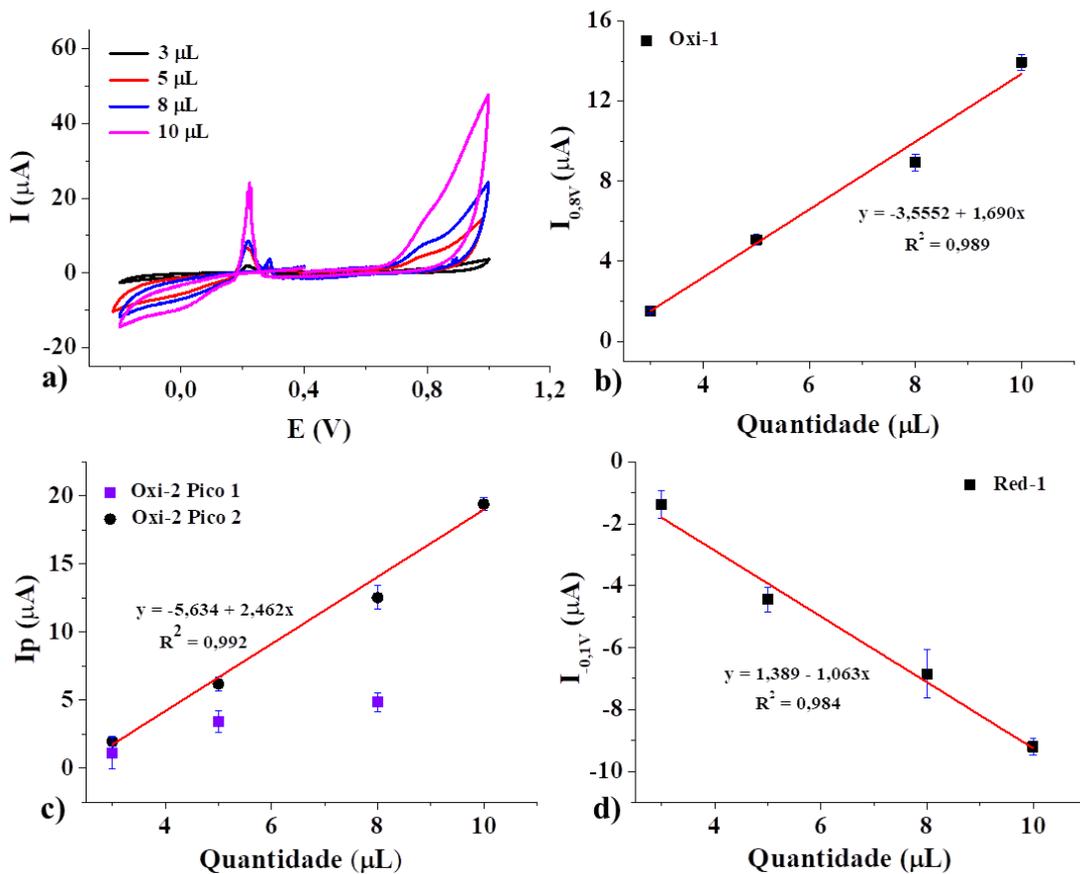
Fonte: A autora (2023)

Os potenciais de início da oxidação Oxi-2 e da redução Red-1 são muito próximos um do outro. Com isso, em todos os intervalos de potencial utilizados para avaliar a atividade de Oxi-2 durante a varredura anódica (fig.33-a) é possível observar que a espécie Red-1 já está reduzindo. Desta forma, é provável que essa redução, ocorrendo durante a varredura neste sentido, altere de alguma maneira a superfície do eletrodo tornando inviável que a substância Oxi-2 sofra oxidação.

### 5.3.3.1 Efeito da concentração

O fato do extrato adicionado à superfície do EPC penetrar na pasta e não se espalhar pelo corpo do eletrodo permitiu que a concentração no mesmo fosse variada através de alteração do volume do extrato adicionado. Os volumes mínimo (3  $\mu\text{L}$ ) e máximo (10  $\mu\text{L}$ ) foram definidos como menor volume possível de ser transferido quantitativamente e o maior volume adicionado sem que a pasta fosse expulsa da cavidade. A concentração do extrato foi variada nesse intervalo e seu efeito do voltamograma do extrato de urucum é mostrado na figura 34.

Figura 34 - Efeito da variação da concentração do extrato de urucum em EtOH no EPC em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M a  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ : a) nos voltamogramas e nas correntes b) oxidação (Oxi-1) c) de pico (Oxi-2) e d) de redução (Red-1).



Fonte: A autora (2023).

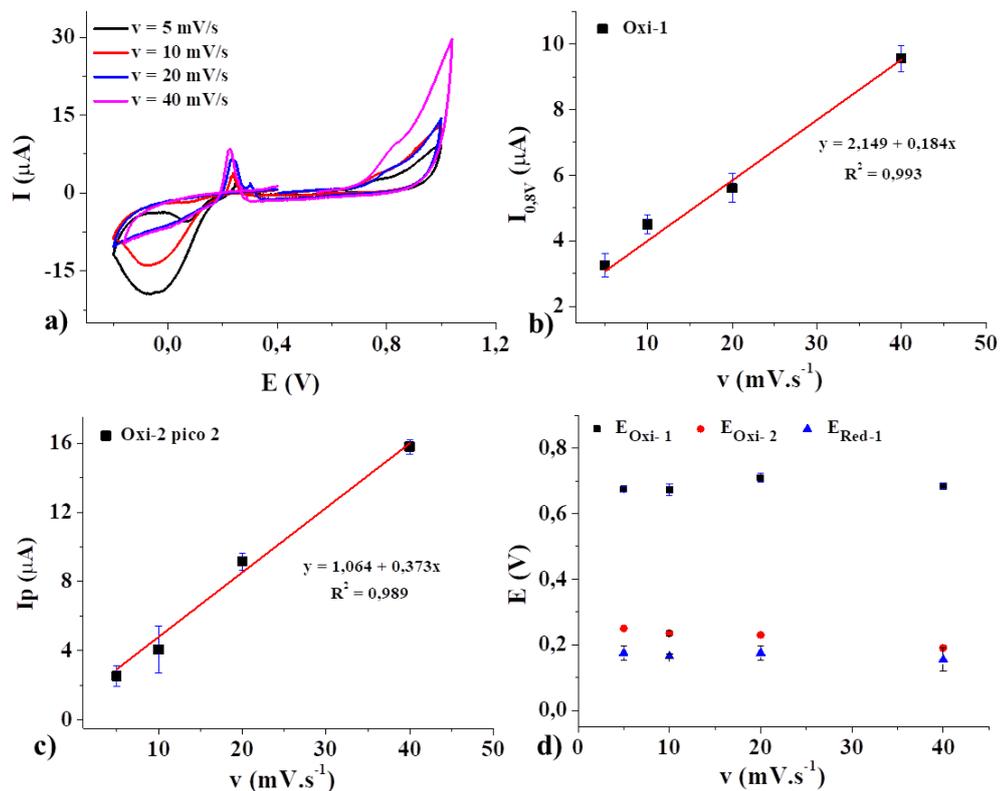
É possível notar um aumento na intensidade dos três sinais eletroquímicos à medida que a quantidade de extrato de urucum na pasta também aumenta (fig.34-a) e esse aumento parece seguir um padrão linear. Esse comportamento é esperado uma vez que ao aumentar a quantidade de extrato adicionado aumenta-se a quantidade de espécies eletroquimicamente ativas dispersas na pasta, e, a corrente gerada é diretamente proporcional às quantidades das espécies eletroativas presentes. Assim como feito para o extrato nas superfícies de Au e carbono vítreo, as correntes para os sinais Oxi-1 e Red-1, que se apresentam como ondas de oxidação e redução, foram extraídas fixando o potencial em 0,8 V e -0,1V para a oxidação e redução respectivamente (fig. 34-b e d). O sinal Oxi-2 apresenta-se na forma de um pico, e nesse caso, a corrente extraída é uma corrente de pico ( $I_p$ ) convencional. Como mostrado inicialmente, esse sinal costuma a aparecer na forma de um sinal duplo, com um pico de menor intensidade seguido de um pico mais intenso. Esse comportamento pode significar que o extrato possui duas substâncias com potenciais de oxidação muito próximos, uma em maior quantidade que a outra ou que o sinal pertence a uma única substância que oxida em duas etapas. Na figura 34-c as correntes de pico dos dois sinais observados em Oxi-2 são plotadas em função da quantidade de extrato presente. O primeiro sinal (menos intenso) não aparece na concentração mais alta de extrato e suas correntes quase não aumentam com o aumento da quantidade da substância enquanto o segundo sinal (mais intenso) aparece em todas as quantidades adicionadas e suas correntes aumentam linearmente com o aumento da concentração. Se os sinais pertencessem a duas substâncias diferentes seria natural que ambos os sinais aumentassem com o aumento da concentração, no entanto, isso é observado apenas para o segundo sinal (mais intenso). Isso pode ser um indicativo de que o sinal duplo (Oxi-2) representa uma substância eletroquímica que oxida em duas etapas e pode explicar o porquê do primeiro sinal não ser observado quando a maior quantidade do extrato é adicionada, já que na maior concentração as moléculas estão mais próximas umas das outras e a primeira etapa, que deve acontecer rapidamente, é suprimida durante a varredura e apenas um sinal é observado.

#### 5.3.3.2 *Efeito da velocidade de varredura*

A variação da velocidade de varredura provocou alterações no voltamograma do extrato de urucum no EPC (fig. 35-a). Houve um aumento das correntes de oxidação dos sinais Oxi-1 e Oxi-2 e esse aumento parece seguir um comportamento linear (fig. 35-b e c),

porém o formato dos seus sinais não foi alterado. Para a redução (Red-1), a variação da velocidade de varredura alterou significativamente o formato da onda de redução: para as velocidades mais baixas, um pico de redução bem definido é observado, e, à medida que a velocidade aumenta sua intensidade é diminuída e uma onda passa a ser observada. A diferença no formato da curva de redução com a variação da velocidade de varredura pode ser um indicativo de que o mecanismo de redução não é favorecido nessas condições, e por isso, apenas em baixas velocidades de varredura um perfil bem definido é observado. A forma como as correntes variam não parece seguir uma tendência clara, por isso, a sua dependência com a velocidade de varredura não foi determinada. Os potenciais de oxidação e redução das substâncias eletroativas (fig.35-d) mostraram-se independentes da velocidade de varredura.

**Figura 35 - Efeito da variação da velocidade de varredura: a) no voltamograma do extrato de urucum em EtOH (5  $\mu$ L), nas correntes b) de oxidação (Oxi-1), c) de pico (Oxi-2) e d) nos potenciais de oxidação e redução no EPC em  $H_2SO_4$  0,1M:**



Fonte: A autora (2023).

Considerando que a substância Oxi-2 apresenta o perfil clássico de uma espécie imobilizada na superfície, com uma corrente de pico bem definida e que varia linearmente com a velocidade de varredura, a seguinte relação pode ser utilizada (BARD & FAULKNER, 1980):

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_o^*$$

Onde  $\Gamma_o^*$  é o recobrimento da superfície pela espécie adsorvida e pode ser escrita como (ZARE, CHATRAEI, & NASIRIZADEH, 2010):

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (5)$$

Combinando as duas equações, a corrente de pico em função da velocidade de varredura para espécies adsorvidas pode ser escrita na forma:

$$I_p = \frac{nFQ}{4RT} v \quad (6)$$

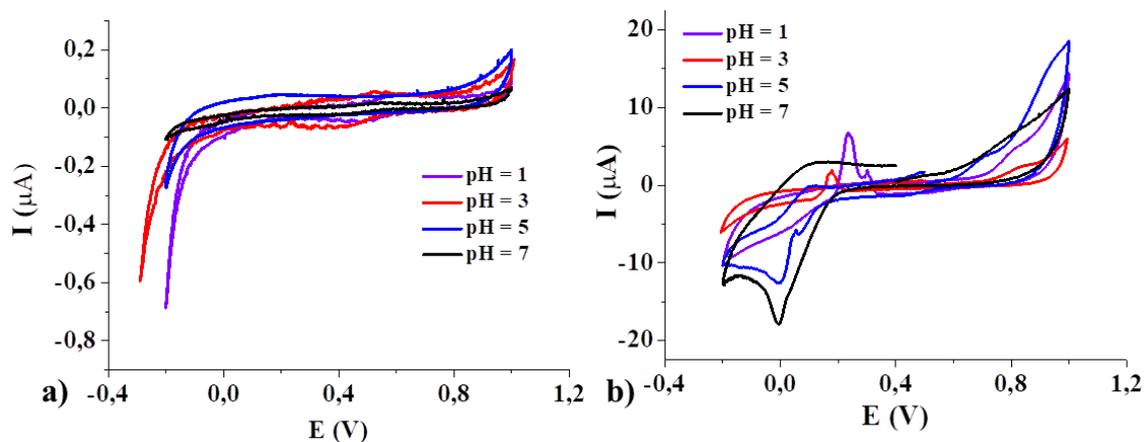
Desta forma, um gráfico de corrente de pico em função da velocidade varredura deve ser uma reta de inclinação  $nFQ/4RT$ . Utilizando a inclinação  $b = 0,373 \mu\text{A.s. mV}^{-1}$  da reta obtida para a espécie Oxi-2 (fig.35-c) e a carga anódica média de  $Q_{\text{am}} = 21 \pm 3 \mu\text{C}$ , se obtêm  $n = 1,8 \pm 0,2$ . Assim, a reação de oxidação da espécie Oxi-2 envolve a transferência de 2 elétrons. Cálculos semelhantes realizados para as demais substâncias não forneceram resultados avaliáveis, possivelmente pelo fato das curvas de oxidação e/ou redução apresentarem-se na forma de ondas e não apresentarem uma corrente de pico verdadeira.

### 5.3.3.3 Efeito do pH

A variação do pH utilizando o eletrodo de pasta e carbono provocou modificações nos voltamogramas do branco e do extrato. No primeiro (fig.36-a), há alterações nas correntes capacitivas e na evolução do hidrogênio (presente na solução) que ocorre mais intensamente em pH's mais baixos onde há maior disponibilidade de íons  $\text{H}^+$ . Para o extrato, o aumento do pH teve grande influência na intensidade e forma dos picos e ondas de oxidação e redução (fig. 36-b). Para a onda de oxidação (Oxi-1), o potencial de oxidação tende a ser deslocado

para valores menores, de forma semelhante ao observado para os eletrodos de ouro e carbono vítreo, porém seu efeito nas correntes de oxidação da substância não apresentou uma tendência clara. A segunda oxidação (Oxi-2), mostrou ter sua ocorrência totalmente dependente do pH: quando pH é elevado o potencial de oxidação é deslocado para valores menos positivos e a intensidade da corrente de oxidação diminui. O pico desaparece completamente à medida que o pH é continuamente aumentado, indicando que a oxidação dessa substância necessita da presença de íons hidrogênio no seu mecanismo de oxidação, e, por isso, só ocorre em meios acentuadamente ácidos ( AZEVEDO, 2014; LOURENÇO, 2004).

**Figura 36 - Efeito da variação da concentração do pH nos voltamogramas a) do EPC e b) de extrato de urucum em EtOH (5  $\mu$ L) em  $H_2SO_4$  0,1M a  $20mV.s^{-1}$ :**



Fonte: A autora (2023).

Para a substância reduzindo (Red-1), aumentar o PH mostrou ter uma grande influência sobre a intensidade e formato da onda de redução. Em pH's mais altos as correntes de redução ficaram mais intensas e a onda ficou mais definida atingindo um pico em 0 V, indicando que o mecanismo de redução da substância é favorecido pela elevação do pH.

Tentativas de elevar o pH para valores mais básicos não foram bem sucedidas, pois os voltamogramas obtidos não eram estáveis e reprodutíveis. Após os experimentos foi possível observar pequenos fragmentos de coloração laranja flutuando na solução, e, após a remoção do eletrodo notou-se que a integridade da pasta estava comprometida. Soluções

básicas são comumente utilizadas para extrair frações solúveis (sais de bixina) do urucum através de reações de saponificação (SILVA, 2009). Introduzir o eletrodo num meio básico pode ter iniciado uma pequena extração dos componentes do extrato na pasta comprometendo sua integridade, alterando a estabilidade das substâncias nela presente, e, com isso, afetando a reprodutibilidade dos experimentos.

### 5.3.3 Cinética eletroquímica

Informações sobre a etapa determinante da velocidade podem ser obtidas através da região de Tafel dos voltamogramas cíclicos dos extratos em cada eletrodo, pois no sopé da onda, a reação é essencialmente controlada por ativação. Esta é uma região, para reações irreversíveis onde a corrente depende exponencialmente do potencial e não é influenciada por efeitos de transporte de massa. Para uma substância que oxida irreversivelmente a inclinação de Tafel,  $b$ , obtida em um gráfico de  $\log i$  vs  $\eta$ , é dada pela equação (BARD & FAULKNER, 1980; BRETT & BRETT, 1993):

$$\log i = \log i_0 - \frac{(1 - \alpha)n_{\alpha}F\eta}{2.3RT} \quad (7)$$

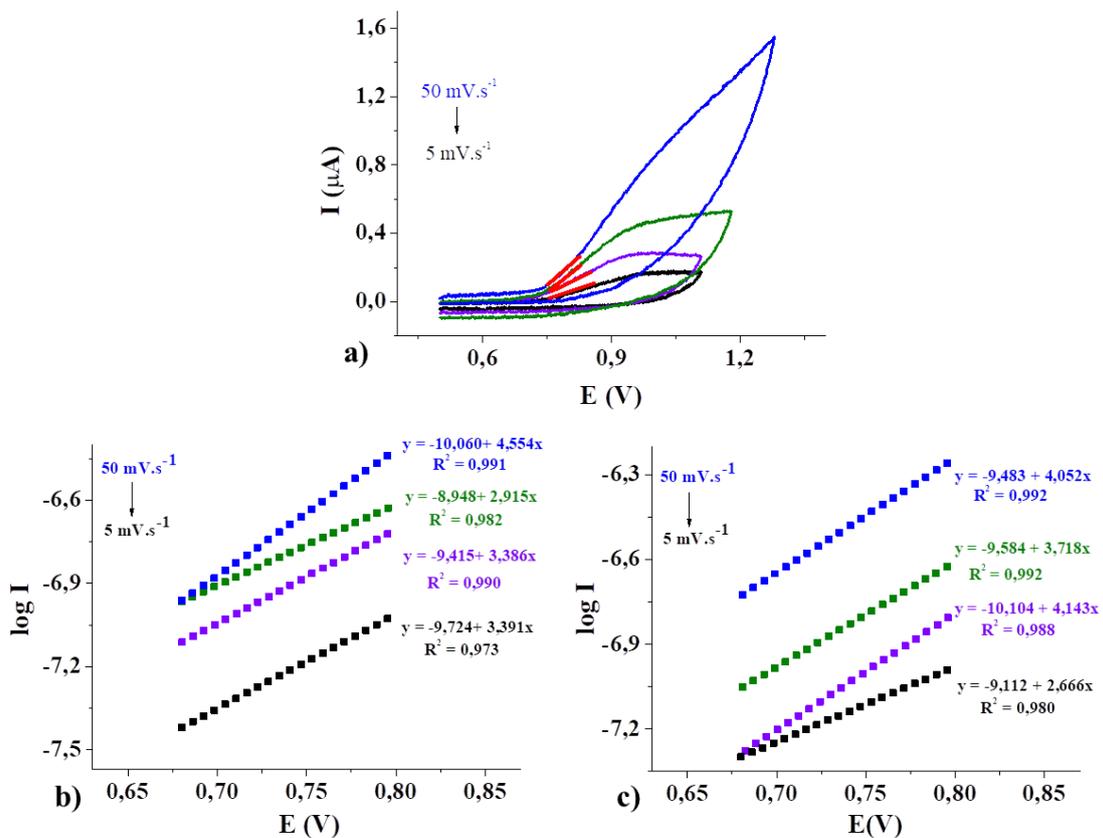
$$b = \frac{(1 - \alpha)n_{\alpha}F}{2.3RT} \quad (8)$$

Onde  $\alpha$  é o coeficiente de transferência,  $n_{\alpha}$  é o número de elétrons transferidos na etapa determinante da velocidade,  $F$ ,  $R$  e  $T$  são as constantes de Faraday, dos gases e a temperatura. Realizando os ajustes nas regiões de Tafel (fig. 37-a) dos voltamogramas no eletrodo de ouro policristalino em diferentes velocidades de varredura, se obtêm várias retas cujas inclinações médias de Tafel são 3,704 e 3,695 para os filmes dos extratos de urucum em etanol (fig. 37-b) e em acetonitrila (fig. 37-c), respectivamente.

É bem aceito na literatura, que o número de elétrons transferidos na etapa determinante da velocidade,  $n_{\alpha} = 1$  (ASADPOUR-ZEYNALI, et.al, 2007; (ZARE, et.al, 2007; COSTA, 2012). O coeficiente de transferência é uma grandeza relacionada à barreira energética atribuída às reações durante processos de oxidação e/ou redução, seu valor varia de

zero a um e pode ser utilizado para obter informações sobre o mecanismo pelo qual as reações eletroquímicas acontecem. Através da equação 8, os coeficientes de transferência calculados são  $\alpha = 0,78$  para o extrato de urucum em EtOH e  $\alpha = 0,77$  para o extrato em MeCN depositados na superfície do eletrodo de ouro policristalino.

**Figura 37 - Cinética eletroquímica dos filmes de extratos de urucum na superfície do eletrodo de Au em  $H_2SO_4$  0,1M nas velocidades de varredura de  $5\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (preto),  $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (violeta),  $20\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (verde) e  $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (azul): a) Região de Tafel analisada e ajustes de Tafel dos extratos b) em EtOH e c) em MeCN.**



Fonte: A autora (2023).

Procedimentos similares foram realizados para os extratos nos demais eletrodos e os valores de coeficiente de transferência e corrente de troca são:

**Tabela 8 - Coeficientes de transferência e correntes de troca para os extratos de urucum em diferentes eletrodos.**

<b>Eletrodo</b>	<b>Extrato</b>	<b>Região de Tafel (V)</b>	<b>Coeficientes*</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>i_0</math> (nA)</b>
			a = -9,537		
Au	EtOH	0,68-0,80	b = 3,704	0,78	0,29
	MeCN		a = -9,571	0,77	0,27
			b = 3,695		
			a = -7,896	0,86	12,7
	EtOH		b = 2,332		
CV		0,7-0,8			
	MeCN		a = -8,026	0,86	9,42
			b = 2,416		
EPC	EtOH	0,66-0,75	a = -8,966	0,72	1,08
			b = 4,721		

\* Valores médios dos coeficientes obtidos através dos ajustes de Tafel dos voltamogramas em diferentes velocidades de varredura demonstrados por Zare, Chatraei, & Nasirizadeh (2010).

Fonte: A autora (2023).

Observando a tabela 8, os coeficientes de transferência para a oxidação do extrato são similares para os três eletrodos. O valor de  $\alpha$  para o eletrodo de carbono vítreo é ligeiramente maior que para os outros dois eletrodos, indicando uma cinética diferente nesta

superfície. Para avaliar se essa diferença está associada ao material do eletrodo ou às condições de sua superfície, a curva voltamétrica do extrato antes da modificação da superfície do eletrodo (fig.27-b) foi utilizada para extrair o valor de  $\alpha$  e compará-lo com o obtido no voltamograma após a modificação, na mesma velocidade de varredura ( $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). O coeficiente de transferência observado no voltamograma antes da modificação da superfície é  $\alpha = 0,70$ , um valor bem próximo dos observados para os outros eletrodos. Com isso, é possível que a alteração das características da superfície do ECV, tenha alterado a cinética de oxidação do extrato, e, por isso, valores maiores de  $\alpha$  são observados. A semelhança observada para os valores de  $\alpha$  dos dois extratos em diferentes eletrodos sugere similaridade de barreira energética e indica que o mecanismo de oxidação é o mesmo em todas as superfícies avaliadas.

Como comentado nas seções anteriores, os voltamogramas dos extratos de urucum avaliados nas superfícies de ouro e carbono vítreo apresentam uma característica peculiar quando avaliados a baixa velocidade de varredura. As correntes de oxidação parecem atingir uma espécie e “corrente limite” antes da varredura atingir seu ponto de retorno. Esse comportamento é típico de fenômenos cinéticos de estado estacionário. É interessante que este perfil seja observado, pois a cinética influenciada por transporte de massa é um comportamento exibido por espécies eletroativas em solução, cuja reação redox depende da velocidade com a qual essas substâncias caminham do seio da solução até a superfície do eletrodo. Esse comportamento não é esperado nesse estudo, pois a espécie eletroativa é depositada diretamente na superfície do eletrodo, e neste caso, sua cinética deveria ser controlada exclusivamente por transferência de carga. No entanto, a diferença observada no formato da curva voltamétrica em função da velocidade de varredura nos leva a considerar que um “efeito de transporte” influencia na cinética de oxidação dos extratos de urucum em superfície.

De acordo com Bard, substâncias eletroativas em solução, possuem cinética controlada pelo transporte de massa das mesmas até a superfície do eletrodo, e, por isso, as correntes de seus voltamogramas atingem um patamar chamado de corrente limite “ $I_L$ ” que é resultado da dificuldade das espécies eletroativas de sair do seio da solução até a superfície do eletrodo. A dependência da corrente com o potencial nesses casos é dada pela equação (BARD & FAULKNER, 1980):

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_L - I}{I}$$

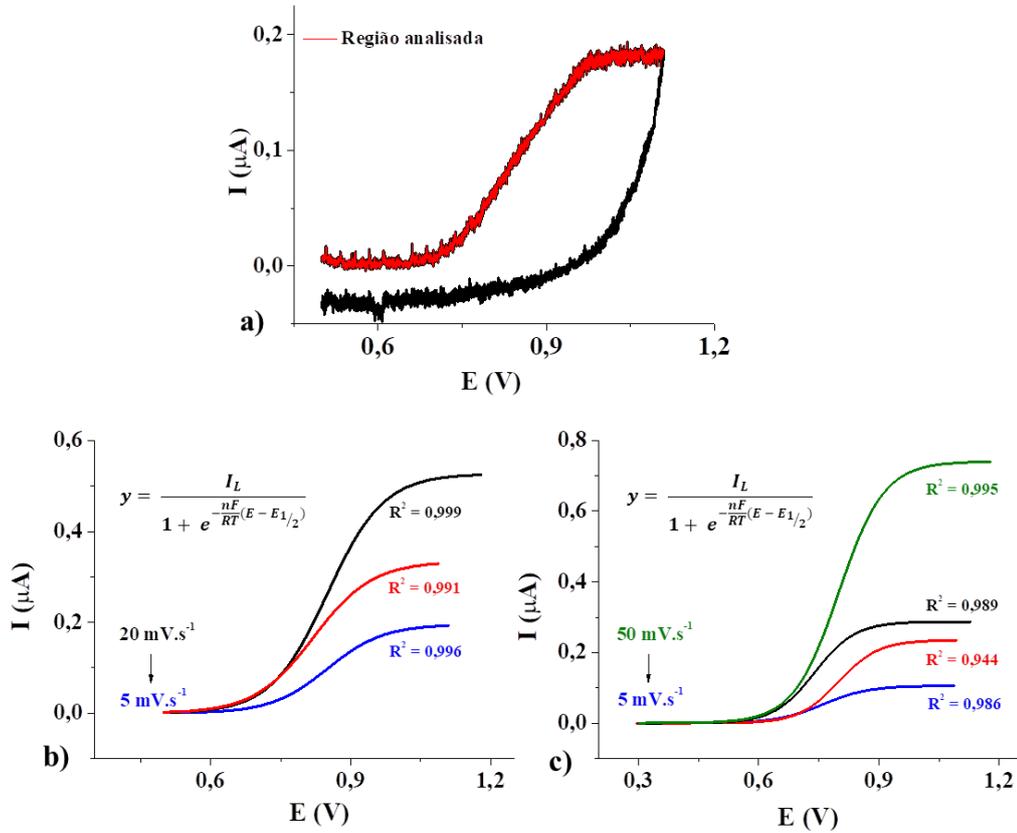
(9)

Onde  $E_{1/2}$  é o potencial de meia onda,  $I_L$  é a corrente limite,  $n$  é o número de elétrons  $F$ ,  $R$  as constantes de Faraday e dos gases e  $T$  a temperatura. Para verificar se os voltamogramas dos extratos de urucum a baixas velocidades de varredura (fig. 36-a) se ajustam bem a uma cinética controlada por difusão, a região dos voltamogramas mostrada na figura 37-a foi avaliada pela equação 9 na forma:

$$I = \frac{I_L}{1 + e^{-\frac{nF}{RT}(E - E_{1/2})}}$$

Através das figuras 38- b e c é possível notar que os voltamogramas dos extratos de urucum em EtOH e MeCN na superfície de ouro policristalino ajustam-se consideravelmente bem á equação 9, indicando que a oxidação dos extratos é afetada por algum tipo de transporte de massa. Resultados semelhantes também foram observados para os extratos avaliados em superfície de carbono vítreo.

**Figura 38 - Regressão não linear da equação de transporte de massa (9) para os extratos de urucum na superfície de Au em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M: a) Região do voltamograma analisada e ajustes para as curvas dos extratos b) em EtOH e c) em MeCN.**



Fonte: A autora (2023).

Utilizando as curvas voltamétricas dos extratos na velocidade de varredura mais baixa onde a consideração de um estado estacionário é razoável, os valores dos parâmetros encontrados nos ajustes são:

**Tabela 9 - parâmetros extraídos dos ajustes de regressão não linear para os extratos de urucum em diferentes eletrodos a baixa velocidade de varredura (5  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).**

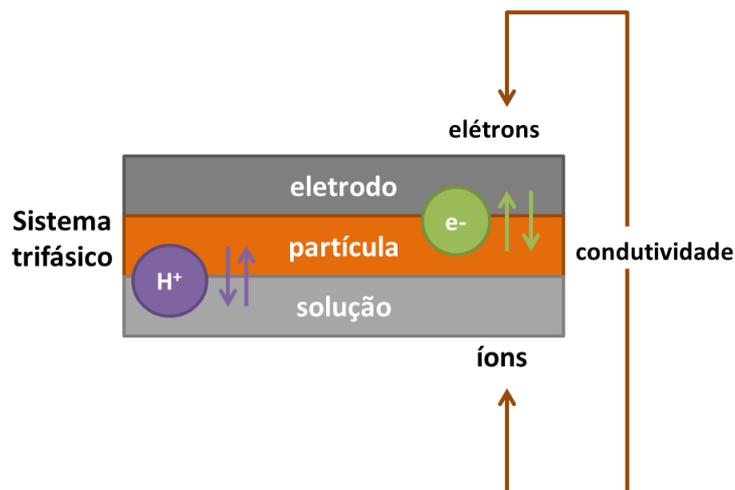
Eletrodo	Extrato	$I_L$	$E_{1/2}$	$nF/RT$	$R^2$
		( $\mu\text{A}$ )	(V)	( $\text{V}^{-1}$ )	
Au	EtOH	$0,19 \pm 0,12$	$0,85 \pm 0,02$	$16,5 \pm 0,1$	$0,996 \pm 0,004$
	MeCN	$0,19 \pm 0,12$	$0,85 \pm 0,02$	$16,5 \pm 0,1$	$0,996 \pm 0,004$

	MeCN	$0,11 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,03$	$17,4 \pm 0,2$	$0,991 \pm 0,001$
	EtOH	$0,60 \pm 0,05$	$0,80 \pm 0,05$	$14,7 \pm 0,1$	$0,996 \pm 0,005$
ECV					
	MeCN	$0,55 \pm 0,10$	$0,69 \pm 0,01$	$19,1 \pm 0,2$	$0,998 \pm 0,002$

Fonte: A autora (2023).

Como demonstrado, os extratos de urucum parecem ter sua cinética eletroquímica afetada por transporte de massa a baixas velocidades de varredura. Embora não pareça fazer sentido, uma vez que os extratos estão adsorvidos diretamente na superfície do eletrodo, isso pode indicar que alguma substância presente na solução participa do mecanismo de oxidação dos extratos nessas superfícies. Scholz e colaboradores desenvolveram um modelo para explicar o processo de oxidação/redução de substâncias eletroativas imobilizadas em superfície (SCHOLZ, et.al, 2000). De acordo com os autores, o processo de transferência de elétrons em um composto sólido imobilizado é caracterizado por condutividade iônica/eletrônica mista que envolve uma reação trifásica na interface eletrodo/partícula/eletrólito com a transferência de elétrons e cátions em direções opostas para garantir a neutralidade do sistema (fig. 39). Desta forma, o progresso da reação eletroquímica pode ser descrito em termos de transferência de elétrons através da interface eletrodo/partícula juntamente com a entrada/saída de prótons na/da partícula sólida através da interface partícula/eletrólito (DOMÉNECH-CARBÓ & DOMÉNECH, 2006; DOMÉNECH-CARBÓ, DOMÉNECH-CARBÓ, & SAURÍ-PERIS, 2005).

Figura 39 - Esquema de transferência iônico-eletrônica em um sistema trifásico.



Fonte: A autora (2023)

Diversos trabalhos que investigam a oxidação eletroquímica de produtos naturais propõem que seus mecanismos de oxidação envolvam prótons  $H^+$  durante a transferência de elétrons (CIZMEK & KOMORSKY-LOVRIÉ, 2018; KISPERT, GAO, & LIU, 2000;). Essa dependência pode ser o motivo do efeito de transporte de massa ser observado nos voltamogramas dos extratos de urucum, uma vez que os íons necessários para a oxidação teriam que difundir do seio da solução até a superfície do eletrodo, para assim, participar da reação de oxidação do extrato. A diferença entre os perfis a alta e baixa velocidade de varredura deve-se ao fato de que, varrendo o eletrodo rapidamente apenas os íons  $H^+$  imediatamente próximos à superfície participam do processo de oxidação enquanto quando o potencial é varrido mais lentamente há a necessidade de que novas espécies difundam através da solução para a superfície do eletrodo, fazendo com que, nessas condições, a cinética de reação seja influenciada pelo transporte de massa do próton.

#### 5.4 Avaliações complementares

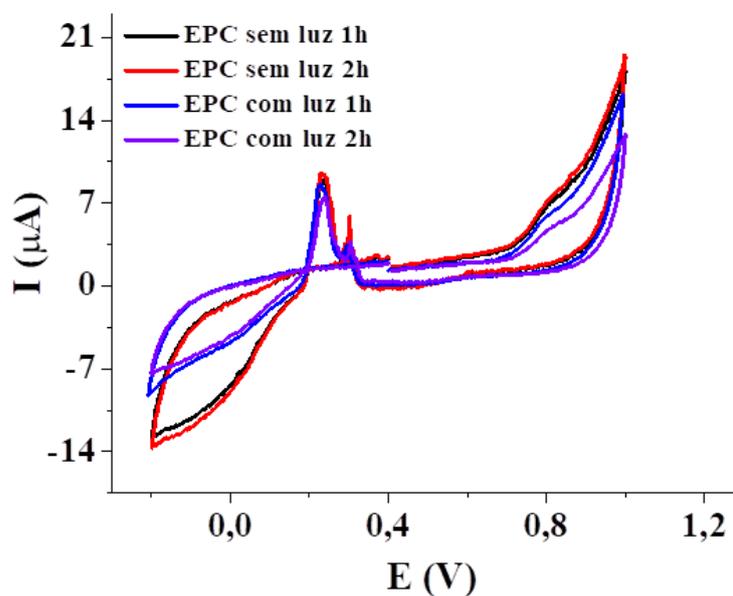
A heterogeneidade dos extratos de urucum obtidos através de extração simples sem que nenhum processo de purificação fosse realizado torna a tarefa de identificar as substâncias eletroquimicamente ativas, desafiadora. Por isso, alguns experimentos foram realizados como

alternativa para obter informações complementares dos componentes eletroativos presentes no urucum.

#### 5.4.1 Interação do extrato com a luz

Como mencionado nas sessões anteriores, a sensibilidade das sementes de urucum e de seus extratos à luz já é algo bem relatado na literatura. Por isso, proteger o eletrodo da luz durante sua secagem e formação dos filmes foi adotado no procedimento experimental. Para verificar se algum dos sinais eletroquímicos observados no eletrodo de pasta de carbono era alterado pela luz, o EPC foi submetido à exposição à luz e seu voltamograma após certo tempo de exposição foi registrado.

Figura 40 - EPC com extrato de urucum (5  $\mu\text{L}$ ) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M a  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ : Sem exposição à luz (preto e vermelho) e com exposição a luz (azul e violeta).



Fonte: A autora (2023).

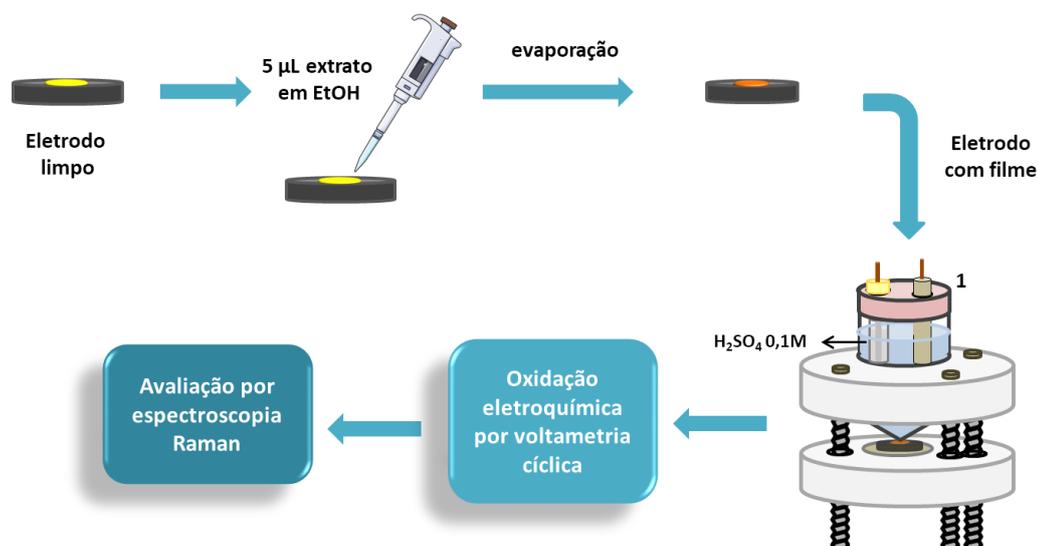
Expor o eletrodo com extrato de urucum à luz provocou alterações no seu voltamograma (fig.40). As ondas Oxi-1 e Red-1 tiveram suas intensidades reduzidas ao serem expostas à luz. É possível notar que a onda de oxidação tem sua intensidade reduzida pela

metade quando o eletrodo é exposto à luz durante duas horas. Para a onda de redução, a diminuição da intensidade é significativa apenas na primeira hora de exposição à luz e quase não se altera após duas horas. A segunda oxidação (Oxi-2) não parece ser afetada pela exposição à luz. Esses resultados indicam que as substâncias Oxi-1 e Red-1 possuem uma estrutura química que interage com a luz, e a diminuição dos seus sinais eletroquímicos pode indicar que as substâncias sofreram degradação em certo grau durante a exposição à luz e isso diminuiu a quantidade da espécie disponível para oxidar/reduzir durante a varredura eletroquímica.

#### 5.4.2 Caracterização espectro-eletroquímica

A espectroscopia Raman foi utilizada como ferramenta para investigar as alterações sofridas pelo extrato após uma oxidação eletroquímica. Para isso, adaptações na configuração da célula eletroquímica foram realizadas para garantir que o extrato depositado na superfície do eletrodo pudesse ser avaliado espectroscopicamente. O esquema de deposição e a célula eletroquímica avaliada são mostrados na fig. 41, onde 5  $\mu\text{L}$  extrato de urucum em EtOH foi evaporado na superfície de um eletrodo de disco de ouro e uma célula de cavidade foi utilizada para a realização do experimento eletroquímico. O eletrodo de disco foi utilizado, pois, seu corpo de baixa espessura (0,5cm) permite sua utilização no espectrofotômetro.

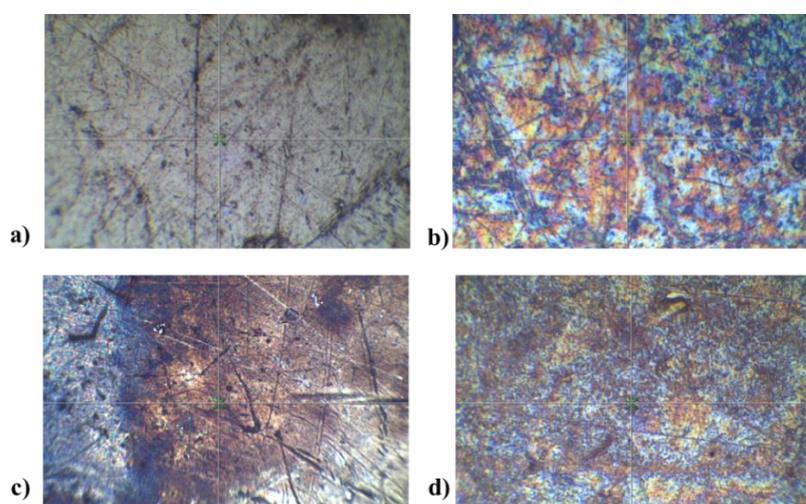
Figura 41 - Esquema da avaliação espectro-eletroquímica do extrato de urucum em EtOH.



Fonte: Adaptado de K.B.O. Silva (2022)

A observação microscópica do filme de extrato de urucum depositado na superfície nos possibilitou ter uma ideia de como as moléculas ficam dispersas na superfície do eletrodo (fig.42). Embora a olho nu, a superfície do eletrodo pareça uniforme, uma visão microscópica permite verificar a presença de ranhuras e pequenos defeitos que, como comentado nas seções anteriores, aumentam sua área superficial e influencia na forma como as substâncias depositadas interagem com a mesma (fig.42-a).

**Figura 42 - Imagens da superfície do eletrodo de disco de Au: a) eletrodo limpo L100x, extrato de urucum em EtOH b) filme L100x c) filme oxidado L10x e d) filme oxidado L100x.**



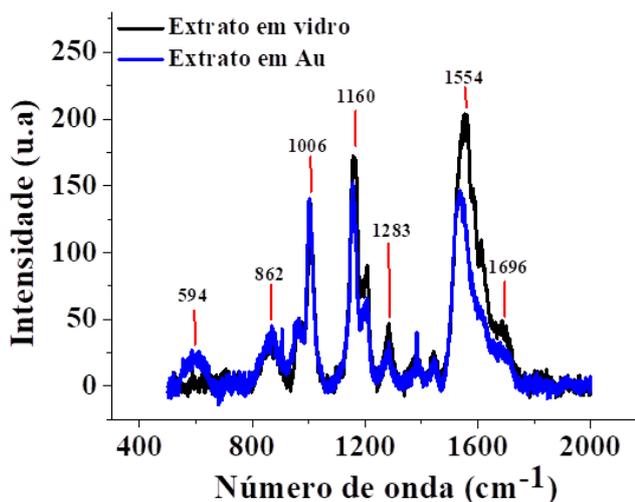
Fonte: A autora (2023).

A adição do extrato (fig.42-b) mostra que o filme depositado não é uniformemente distribuído na superfície e exibe pequenos aglomerados que aparecem na forma de manchas alaranjadas ao longo do eletrodo. A visualização microscópica do extrato oxidado mostrou alteração na coloração inicialmente observada. Uma visualização menos ampliada (lente 10x, fig. 42-c) mostra uma grande mancha escura cobrindo boa parte da superfície do eletrodo e uma ampliação maior (lente 100x, fig. 42-d) permite visualizar melhor essa alteração, com várias partes de coloração escura, provavelmente devido à oxidação do extrato.

Uma comparação entre o espectro Raman do filme do extrato de urucum em EtOH na superfície do vidro (mostrado na sessão 5.1.2.2) e na superfície do eletrodo de ouro é exibida na figura 43. Com exceção do pico em  $594\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao ouro, há uma boa

correlação entre os espectros do extrato na superfície do ouro e os observados em placa de vidro, indicativos da bixina.

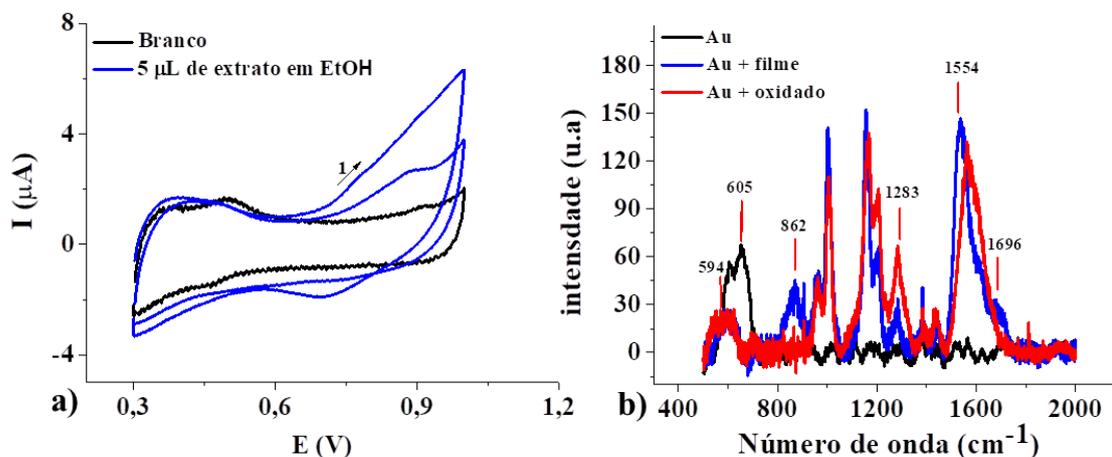
**Figura 43 - Comparação entre os espectros do filme do extrato de urucum em EtOH evaporados na superfície do vidro (lâmina de microscópio) e eletrodo de ouro.**



Fonte: A autora (2023).

A ideia por trás da técnica é obter um espectro do extrato na superfície do eletrodo, submetê-lo a uma oxidação eletroquímica e posteriormente registrar novamente seu espectro para identificar possíveis alterações em sua estrutura. A oxidação do extrato de urucum na superfície do eletrodo de disco de ouro mostrou um comportamento semelhante ao observado para o eletrodo de ouro policristalino: a oxidação irreversível do extrato ocorre na região da dupla camada elétrica, com uma oxidação intensa no primeiro ciclo e diminuição nos demais (fig. 44-a).

Figura 44 - Oxidação do filme do extrato de urucum em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M a  $20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ : a) voltamograma (1° e 5° ciclo) e b) comparação dos espectros Raman antes e depois da oxidação .



Fonte: A autora (2023).

O espectro obtido após a oxidação do extrato mostrou a alteração de alguns sinais obtidos anteriormente (fig.44-b). O sinal do ouro em  $650\text{ cm}^{-1}$  foi deslocado para  $594\text{ cm}^{-1}$  e teve sua intensidade diminuída na presença do extrato e isso pode ser devido ao bloqueio da superfície provocado pela deposição do mesmo.

Após a oxidação do extrato notou-se o desaparecimento do pico em  $862\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao estiramento de ligações C-O-C, e do “ombro” em  $1696\text{ cm}^{-1}$  referente à carbonila. Além disso, deslocamento do sinal em  $1554\text{ cm}^{-1}$ , atribuído a ligações C=C sugere alteração na instauração da cadeia, indicando que o extrato sofreu quebra de ligações duplas durante o processo de oxidação eletroquímica. O pico em  $1283\text{ cm}^{-1}$ , atribuído a grupos C-C-H teve sua intensidade aumentada após a oxidação do extrato, isso pode ser um reflexo da diminuição da instauração sugerida pela alteração sofrida pelo pico C=C ( $1554\text{ cm}^{-1}$ ) durante a oxidação eletroquímica.

## 5.5 Identificação das substâncias eletroativas

As caracterizações espectroscópicas dos extratos e sementes mostram espectros afirmativos para o carotenoide presente em maior quantidade no urucum, a bixina. No geral,

três sinais de substâncias eletroativas foram detectados durante a avaliação eletroquímica dos extratos de urucum. Dois deles foram observados apenas no EPC e devem ser oriundos de compostos minoritários presentes no urucum que não se destacaram nos espectros dos extratos e das sementes e a falta de experimentos específicos dificulta a identificação dos mesmos. No entanto, algumas propostas podem ser feitas, considerando os compostos conhecidos por fazerem parte da composição das sementes de urucum, conforme foram descritos na introdução deste trabalho.

### **5.5.1 Substância eletroativa Oxi-1**

O sinal que aparece em todos os eletrodos utilizados entre 0,7-1,1V. As caracterizações espectroscópicas em conjunto com as medidas eletroquímicas, além do fato deste sinal eletroquímico ser afetado quando exposto a luz indicam fortemente que a oxidação observada nesta faixa de potencial é da bixina. Alguns trabalhos na literatura demonstram que a oxidação de carotenoides em diferentes eletrodos ocorre nessa faixa de potencial e possuem uma curva de oxidação semelhante à observada neste trabalho (KISPERT, GAO, & LIU, 2000; KISPERT & JEEVARAJAN, 1996; CIZMEK & KOMORSKY-LOVRIC, 2019) inclusive para a bixina avaliada em meio orgânico (TAY-AGBOZO, STREET, & KISPERT, 2018).

### **5.5.2 Substância eletroativa Oxi-2**

Embora, não haja muitas informações que possam ajudar na identificação desse sinal eletroquímico, uma particularidade de sua oxidação pode dar um indício de qual substância pode estar oxidando: a observação do sinal de oxidação Oxi-2 depende do sentido da varredura. Neste caso, a oxidação desta substância eletroquímica só é observada durante a varredura no sentido catódico. Comportamentos semelhantes com sinais de oxidação enquanto uma perturbação no sentido de redução é realizada, são observados na literatura para a eletro-oxidação catalítica de álcoois. (HARDACRE, et.al, 2018; KATIKAWONG, et.al, 2009; LEE, et.al , 2006; SCHMIFT, et.al, 1996; ADZIC & SHAO, 2005). É possível que a dependência da oxidação desta substância com a direção da varredura esteja associada a

alguma espécie de catálise no eletrodo de pasta de carbono. Como foi mencionado na sessão 5.3.3, a ocorrência da redução Red-1 durante a varredura no sentido anódico desativa o eletrodo para a oxidação de Oxi-2, indicando que da alguma forma, esta oxidação depende do estado da superfície, e esse pode ser o motivo deste sinal não ser observado nas demais superfícies avaliadas.

Dentre as substâncias presentes no urucum, o geranilgeraniol, seu óleo essencial, é um álcool de cadeia longa (diterpeno) presente em grande quantidade no urucum e extraído em meio apolar, pode ser a substância oxidando entre 0,3-0,1 V. A dificuldade de identificar sinais dessa substância nos espectros de infravermelho das sementes e dos extratos pode ser um reflexo da simplicidade de sua estrutura, que apresenta picos de absorção em regiões semelhantes ao da bixina e por isso podem estar confundidos em seus espectros (SDBS N° 10569, 2022). Além disso, a imensa maioria dos trabalhos que avaliam a oxidação eletroquímica de álcoois, o fazem em meio ácido e descrevem em seus mecanismos o envolvimento de prótons e transferência de dois elétrons durante o processo de oxidação (LEE, UMEDA, & UCHIDA, 2006; (ADZIC & SHAO, 2005). Como foi demonstrado nas sessões 5.3.3.1 e 5.3.3.3, o sinal Oxi-2 oxida através da transferência de dois elétrons e é altamente dependente do pH ocorrendo apenas em meios consideravelmente ácidos. Esses indícios contribuem para a possibilidade deste sinal representar a oxidação do geranilgeraniol, no entanto, mais estudos devem ser feitos para que uma afirmação mais categórica possa ser feita.

### **5.5.3 Substância eletroativa Red-1**

A terceira substância eletroativa observada no extrato de urucum sofre uma redução irreversível entre 0,1 e -0,2 V. As principais informações obtidas neste trabalho sobre esta espécie foram: a dependência com pH, tendo sua reação favorecida em valores mais altos, a melhora de resolução do sinal em velocidades mais baixas e a diminuição do seu sinal quando o extrato depositado é exposto a luz antes do experimento eletroquímico.

Dentre as classes de substâncias presentes no urucum com atividade eletroquímica conhecida na literatura há o flavonoide apegenina, no entanto sua estrutura química não mostra muitos grupos funcionais susceptíveis a oxidação. De fato, as maiorias dos trabalhos verificam a oxidação dos grupos cetônicos presentes nas cadeias moleculares dos flavonoides

(BRETT & JANEIRO, 2004; BRETT & GHICA, 2005; MILICEVIC, MILETIC, & JOVANOVIC, 2019). Deste modo, é pouco provável que o sinal de redução observado seja referente a esta espécie.

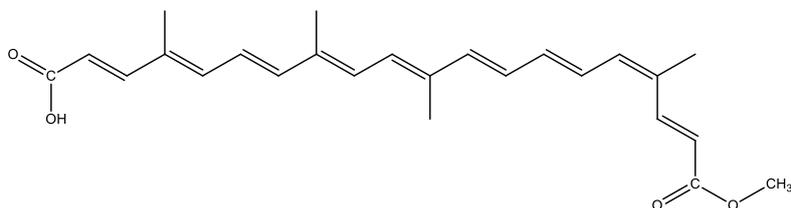
Alguns estudos sobre a eletroquímica de carotenoides observam picos de redução quando avaliados em meio orgânico. A maioria dessas reduções são atribuídas a reversibilidade dos cátions radicais formados (FOCSAN, PAN, & KISPERT, 2014; (KISPERT & JEEVARAJAN, 1996; SAMOKHVALOV, et.al, 1975). Entretanto, o fato de todas as atividades eletroquímicas observadas neste trabalho serem irreversíveis afasta essa ideia.

Como demonstrado na sessão 5.4.1, a onda de redução do extarto de urucum também é afetada pela exposição à luz, uma característica comum de carotenoides. Mairanovsky e colaboradores avaliaram que embora os carotenoides possuam propriedades doadoras de elétrons mais fortes, em certas condições podem atuar como aceitadores de elétrons e reduzirem através da formação de ânions e ânions radicais (MAIRANOVSKY, et.al, 1975). Como esta redução ocorre independente da bixina ser oxidada durante a varredura, duas possibilidades podem ser exploradas: a redução pode ser de outro carotenoide presente nas sementes de urucum, a norbixina, que possui um grupo ácido em cada extremidade da cadeia ou o fato da bixina apresentar diferentes grupos oxigenados em suas extremidades faz com que a parte ácida da molécula esteja suscetível a processos de redução. Desta forma, é possível que a espécie que reduz entre 0,1 e -0,2 V seja um dos carotenoides, no entanto assim como sugerido para a substância Oxi-2, mais experimentos são necessários para investigar e confirmar a natureza deste sinal eletroquímico.

## **5.6 Considerações sobre o mecanismo de oxidação da bixina**

Como mencionado na introdução, a maioria dos trabalhos acadêmicos descrevem os mecanismos de oxidação de carotenoides através da produção de cátions radicais extremamente reativos. Dependendo do meio utilizado, esses radicais são estabilizados por tempo suficiente para que uma reação reversível seja observada. No entanto, o mais comum é que a alta reatividade faça com que os mesmos reajam rapidamente reorganizando sua estrutura e apresentando uma eletroquímica de reação irreversível (KISPERT &

JEEVARAJAN, 1996). De fato, todas as substâncias eletroativas observadas neste trabalho mostraram sinais eletroquímicos irreversíveis. Considerando a estrutura química da bixina:



que teve sua oxidação entre 0,7-1,1V identificada através das caracterizações eletroquímicas e espectroscópicas, a irreversibilidade observada para a sua oxidação pode estar associada à reatividade dos radicais formados que, em meio aquoso, são rapidamente protonados. No entanto, a oxidação da bixina observada neste trabalho sugere um mecanismo de oxidação ligeiramente diferente observado na literatura. Enquanto a maioria dos estudos aponta que a oxidação de carotenoides ocorre através da formação de cátions radicais formados pela quebra de ligações duplas ao longo da cadeia carbônica, a caracterização espectroscópica após a oxidação eletroquímica do extrato sugere que além de alterações na insaturação da cadeia, há mudanças na configuração molecular associada às ligações carbono-oxigênio. Ambas as extremidades da molécula apresentam grupos oxigenados, porém a extremidade ácida já está na sua forma mais oxidada. Desta forma, é possível que a oxidação da bixina se inicie em alguma insaturação próxima à extremidade éster e que durante a aplicação do potencial no eletrodo a conjugação do sistema favoreça o envolvimento do grupo oxigenado no processo de oxidação da molécula, e, com isso, um mecanismo de oxidação diferente do indicado pela literatura com reações acontecendo apenas ao longo da cadeia carbônica, seja observado. Considerando que esse mecanismo deve transformar o grupo éster em um grupo ácido, é possível que a oxidação observada seja uma conversão eletroquímica de bixina em norbixina, já que esta possui um grupo ácido em cada extremidade da cadeia carbônica.

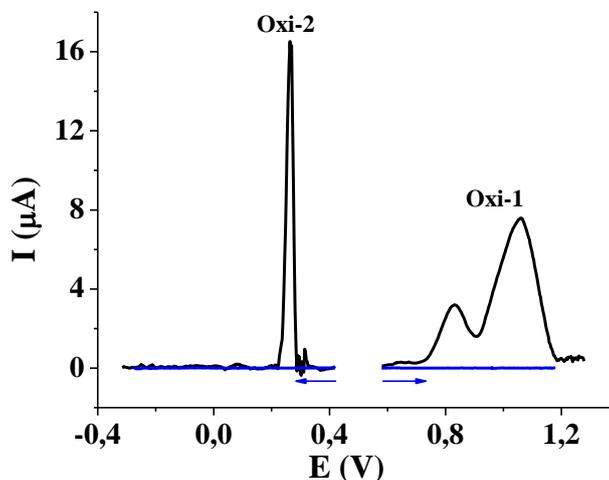
## 5.7 Determinação do poder antioxidante do extrato de urucum

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma ferramenta bastante utilizada para avaliação de compostos naturais por sua boa sensibilidade e sinal (um pico) que facilita a interpretação e análise dos dados. O EPC com extrato de urucum em etanol foi avaliado por VPD e o voltamograma é mostrado na figura 45. Dois sinais de oxidação podem ser vistos nas

mesmas regiões observadas na voltametria cíclica, no entanto, algumas características experimentais devem ser destacadas:

- 1- O sentido da varredura tem influência sobre a observação dos dois picos no voltamograma: realizando a varredura de potencial dos valores negativos para os positivos apenas o pico Oxi-1 é observado e varrendo do potencial positivo para o negativo apenas o pico Oxi-2 é observado, por esse motivo, o registro de ambos os picos foram realizados separadamente, como indicado pelas setas azuis. A redução (Red-1) não é observada em qualquer sentido de varredura adotado.
  
- 2- O pico de oxidação Oxi-1 sempre aparece como um sinal duplo em forma de ondas. Para identificar se o sinal se trata da oxidação de duas espécies com potenciais de oxidação próximos ou uma espécie oxidando em duas etapas, alterações nos parâmetros de obtenção do voltamograma foram realizados na tentativa de resolver os dois sinais, mas os dois parecem estar correlacionados, pois, qualquer mudança de parâmetro afeta os dois igualmente: ou são diminuídos ou são intensificados. Assim é razoável pensar que os sinais observados representam uma única espécie oxidando em duas etapas já que ondulações semelhantes podem ser observadas em alguns voltamogramas cíclicos já mostrados, e, a diferença de resolução pode ser uma característica desta técnica, mais sensível.

**Figura 45 - Voltamograma de pulso diferencial do eletrodo de pasta de carbono com extrato de urucum em EtOH (5 $\mu$ L) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M. Linha de base corrigida.**



Fonte: A autora (2023).

O conceito de poder antioxidante de compostos naturais (via eletroquímica) foi proposto inicialmente pelo grupo Escarpa e descreve que substâncias que oxidam em potenciais menores possuem maior poder antioxidante, pois quanto menor o potencial maior é a capacidade doadora de elétrons e quanto maior a corrente de pico, maior a taxa de transferência de elétrons e/ou a quantidade de espécies eletroativas (ESCARPA A., GONZÁLEZ, & BLASCO, 2004). Considerando essa abordagem, dentre espécies eletroativas presentes nos extrato de urucum, a substância Oxi-2 apresentara um poder antioxidante maior que a substância Oxi-1 (bixina), pois oxida em um potencial consideravelmente menor.

Comparando os potenciais de oxidação atribuídos a bixina (Oxi-1) com valores relatados na literatura para outros carotenoides (tab. 10) observa-se que esta classe de compostos costuma apresentar atividade eletroquímica em regiões de potencial próximas a depender do meio em que são avaliados. Neste caso, uma avaliação baseada apenas nos valores do potencial onde as oxidações das espécies se iniciam, permite atribuir e elas um poder antioxidante similar. No entanto, dentre os carotenoides citados, os potenciais de oxidação cantaxantina e astaxantina são os que mais se aproximam dos potenciais encontrados para a bixina neste trabalho. Isso pode ter relação com o fato de que, assim como a bixina, essas estruturas possuem substituintes carboxilados nas extremidades de suas cadeias conjugadas e que de alguma forma, esses substituintes podem contribuir para que essas

espécies oxidem em potenciais ligeiramente diferentes dos observados para o  $\beta$ -caroteno e luteína, que não contém tais substituintes.

**Tabela 10 - Comparação entre os potenciais de oxidação da bixina (Oxi-1) com outros carotenoides avaliados na literatura.**

Substância	Técnica	Meio	$E^1_{ox}$ (V)	$E^2_{ox}$ (V)	Referência
Luteína	VOQ	Aquoso	0,687	-	Cizmek et.al, 2019
$\beta$ -caroteno	VC	Orgânico	0,634	-	Focsan, et.al, 2014
	VC	Aquoso	0,88	-	Cizmek et.al, 2019
Astaxantina	VC	Orgânico	0,775	0,972	Focsan, et.al, 2014
	VC		1,16	-	Cizmek et.al, 2019
	VC	Misto Aq: Org	0,600	0,900	Munoz, et. al, 2016
<b>Bixina</b>	<b>VC e VPD</b>	<b>Aquoso</b>	<b>0,729</b>	<b>0,906</b>	<b>Este trabalho</b>
		Orgânico	0,94	1,14	Tay-agbozo, et.al, 2018
Cantaxantina	VC	Orgânico	0,775	0,972	SAVÉANT, et.al, 2001

Fonte: A autora (2023).

O índice eletroquímico (IE) pode ser calculado através da equação abaixo, como a soma das razões entre as correntes de pico ( $I_p$ ) e potenciais de pico ( $E_p$ ) de cada sinal de oxidação observado no voltamograma de pulso diferencial:

$$IE = \frac{I_{p1}}{E_{p1}} + \frac{I_{p2}}{E_{p2}} + \dots + \frac{I_{pn}}{E_{pn}} \left( \frac{\mu A}{mV} \right)$$

Esse índice eletroquímico indica a quantidade total de antioxidantes presentes na amostra em análise e para o extrato de urucum em etanol foi de  $0,14 \mu A.mV^{-1}$ . Nota-se que este IE é influenciado majoritariamente pela substância que apresenta atividade eletroquímica entre 0,3-0,2 V, pois esta oxida em um potencial menor e possui uma corrente de pico maior. Como as caracterizações espectroscópicas indicam que o extrato é composto basicamente de bixina, é interessante calcular o índice eletroquímico do extrato considerando apenas o sinal referente a esta espécie e comparar com valores previstos pela literatura. Tradicionalmente, a avaliação eletroquímica de carotenoides não utiliza o IE como parâmetro para classificar o poder antioxidante dessas espécies, no entanto, este pode ser facilmente obtido através das correntes e potenciais de pico apresentados por tais carotenoides.

Como mencionado na introdução deste trabalho, a avaliação do índice eletroquímico e sua comparação entre substâncias deve ser realizada com cautela, pois os valores de corrente e potencial de pico utilizado para seu cálculo são extremamente dependentes das condições experimentais adotadas e das quantidades de substância eletroativa avaliadas. No entanto, de acordo com os valores listados na tabela 11, embora os meios e superfícies em que foram avaliados sejam diferentes, os carotenoides mostram atividades eletroquímicas semelhantes, oxidando entre 0,4 - 0,8 V e apresentando corrente de pico variando entre unidades de dezenas de  $\mu A$ . Isso faz com que o IE calculado pra essa classe de compostos seja comparável. Desta forma, observa-se que o índice eletroquímico da bixina obtido neste trabalho é semelhante aos indicados para os carotenoides astaxantina e cantaxantina. Novamente, essa compatibilidade pode estar associada à similaridade de suas estruturas químicas que faz com que esses carotenoides tenham poderes antioxidantes similares.

Tabela 11 - Comparação entre o índice eletroquímico (IE) da bixina e o de outros carotenoides avaliados na literatura.

Carotenoide	Técnica	Meio	Superfície	I <sub>pa</sub> μA	E <sub>pa</sub> mV	IE μA. mV <sup>-1</sup>	Referência
Astaxantina	VC	HClO <sub>4</sub> + C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (80:10:10)	ECV	7; 8	600; 900	0,02	Munoz, et.al, 2016.
	VC	TBABF <sub>4</sub> + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Pt	10; 15	775; 952	0,03	Focsan, et. al, 2014.
	VOQ	HClO <sub>4</sub>	PIGE	35; 30	470; 650	0,12*	Cizmek & Komorsky-lovric,2019.
	VOQ	TBABF <sub>4</sub> + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Pt	6,4	540	0,01	Kispert, et.al, 2000.
β-caroteno	VC		Pt	10	634	0,02	Focsan, et. al, 2014
	VC	TBABF <sub>6</sub> + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Au	40	634	0,06	Savéant, et.al, 2001.
	VOQ	HClO <sub>4</sub>	PIGE	30	477	0,08*	Cizmek & Komorsky-lovric,2019.
<b>Bixina</b>	<b>DPV</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>EPC</b>	<b>3,7; 7,8</b>	<b>828; 1060</b>	<b>0,01</b>	<b>Este trabalho</b>

	CV	TBABF <sub>6</sub> + THF	Pt	11,5; 26,5	940; 1140	0,04	Tay-Agbozo, et.al, 2018.
Cantaxantina	VC	TBABF <sub>6</sub> + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Au	7: 15	775: 972	0,02	Savéant, et.al, 2001.
		TBABF <sub>4</sub> + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Pt	10; 15	689; 894	0,03	Kispert & Jeevarajan, 1996.
	VOQ	TBABF <sub>4</sub> + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Pt	1,4	600	0,002	Kispert, et.al, 2000
Licopeno	VC	Et <sub>4</sub> NClO <sub>4</sub> em MeCN +C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (2:1)	Hg	1,75	580	0,003	Mairanovsky, et.al, 1975.
Luteína	VOQ	HClO <sub>4</sub>	PIGE	80	687	0,12*	Cizmek & Komorsky-Lovric, 2019

\* Os gráficos usados para extrair os valores de I<sub>pa</sub> deste trabalho não estavam com a linha de base corrigida, esse pode ser o motivo pelo qual os valores de IE para os carotenoides nesta referência serem maiores que as demais.

Fonte: A autora (2023).

## 6 CONCLUSÃO

A caracterização espectroscópica das sementes e dos extratos de urucum indicou a presença do seu corante principal, o carotenoide bixina. A voltametria em estado sólido permitiu uma caracterização direta de extratos de urucum em meio aquoso, e, esta a análise em superfície mostrou que a resposta eletroquímica do extrato é fortemente influenciada pelo tipo e estado da superfície do eletrodo de trabalho.

Três substâncias eletroativas foram identificadas nos extratos de urucum. A primeira delas, a bixina, oxida entre 0,7-1,2 V. Os coeficientes de transferência variaram entre  $0,72 \leq \alpha \leq 0,86$  dependendo do extrato e do eletrodo utilizado e indicam mecanismos de oxidação semelhante em todas as superfícies. Além disso, embora o extrato esteja adsorvido, a cinética de reação da bixina mostrou ser influenciada por transporte de massa de prótons na solução a baixa velocidade de varredura. A espectroscopia Raman realizada após a oxidação eletroquímica do extrato de urucum em etanol mostrou que a bixina sofreu alterações em sua estrutura química com modificações na insaturação da cadeia carbônica e no grupo éster presente em uma de suas extremidades indicando a oxidação eletroquímica convertendo bixina em norbixina.

A natureza das demais substâncias eletroativas presentes no urucum não pôde ser completamente elucidada. No entanto, algumas sugestões foram feitas: Para a substância eletroativa entre 0,3-0,1 V, a oxidação do geranylgeraniol foi indicada. Essa oxidação com transferência de dois elétrons mostrou ser sensível ao estado da superfície e ao pH da solução, ocorrendo apenas em meio acentuadamente ácido. A substância eletroativa entre 0,1 e - 0,2V foi indicada como provável redução de um carotenoide (bixina ou norbixina) através da redução dos grupos ácidos presentes nas suas extremidades. No entanto, mais experimentos são necessários para esclarecer a identidades de tais espécies.

A bixina apresentou um potencial de oxidação e IE similar a outros carotenoides substituídos com grupos oxigenados, como a astaxantina e cantaxantina e tendo seu poder antioxidante comparável ao dessas substâncias.

## REFERÊNCIAS

- AREIAS, M., & SILVA, S. (2000). *ROTEIRO PARA FABRICAÇÃO DE ELETRODOS DE REFERÊNCIA Ag/AgCl em KCl(sat)*. LEEMM-DQF-UFPE.
- ABREU, T. (2012). Eletro-oxidação de metanol e etanol sobre PtAu/C em meio alcalino. 36 f. *Trabalho de Conclusão de Curso ( Graduação em Química)* - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012..
- ADZIC, R., & SHAO, M. (2005). Electrooxidation of ethanol on a Pt electrode in acid solutions: in situ ATR-SEIRAS study. *Electrochimica Acta*, 2415–2422.
- ASADPOUR-ZEYNALI, K., JOUYBAN, A., & MAJIDI, M. (2007). Electrocatalytic oxidation of hydrazine at overoxidized polypyrrole film modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 6248–6253.
- AZARIAS, C. (2017). UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PARA DETERMINAÇÃO RÁPIDA DO ÍNDICE DE MATURAÇÃO EM QUEIJOS CORINO, MATURADO E GOUDA FABRICADOS COM LEITE DE OVELHA. 104 f. *Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia do leite e Derivados)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2017.*
- AZEVEDO, L. (2014). ELETROOXIDAÇÃO DE TADALAFILA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO E DETERMINAÇÃO DIRETA EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR VOLTAMETRIA. 79 f. *Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.*
- BANICA, F., SLIWKA, H.-R., PARTALI, V., & ION, A. (2002). Electrochemistry of a carotenoid self-assembled monolayer. *Electrochemistry Communications*, 674–678.
- BARA, M., SERRANO, S., ASQUIERI, E., LÚCIO, T., & GIL, E. (2008). MEDIDA DEL POTENCIAL ANÓDICO EN ESTADO SÓLIDO: UNA HERRAMIENTA PARA LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FITOTERÁPICOS. *Latin American Journal of Pharmacy*, 89-92.
- BARD, A., & FAULKNER, L. (1980). *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. New York: Wiley & Sons.
- BENITES, T., RIBEIRO, W., GOÉS, M., PEREIRA, A., & BUENO, P. (2014). EFEITOS DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL NAS PROPRIEDADES DE PASSIVAÇÃO DE MONOCAMADAS. *Quim. Nova*, 1533-1537.
- BIANCHI, M., & ANTUNES, L. (1999). RADICAIS LIVRES E OS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES DA DIETA. *Rev. Nutr., Campinas*, 123-130.

BICAS, J., & FELIPE, L. (2016). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química e Sociedade*, 39, 120-130.

BLASCO, A., GONZÁLEZ, M., & ESCARPA, A. (2004). ELECTROCHEMICAL APPROACH FOR DISCRIMINATING AND MEASURING PREDOMINANT FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS USING DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY: TOWARDS AN ELECTROCHEMICAL INDEX OF NATURAL ANTIOXIDANTS. *Analytica Chimica Acta*, 71–81.

BLASCO, A., GONZÁLEZ, M., & ESCARPA, A. (2005). “ELECTROCHEMICAL INDEX” AS A SCREENING METHOD TO DETERMINE “TOTAL POLYPHENOLICS” IN FOODS: A PROPOSAL. *Analytica Chimica Acta*, 237-244.

BRETT, A., & BRETT, C. (1993). *ELECTROQUÍMICA: Princípios, Métodos e Aplicações*. ALMEDINA.

BRETT, A., & GHICA, M.-E. (2005). Electrochemical Oxidation of Ruti. *Electroanalysis*, 313-318.

BRETT, A., & JANEIRO, P. (2004). Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 109–115.

CABRAL, D. (2018). AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.) NA CORROSÃO DO AÇO CARBONO EM NaCl 3,5 %. 80 f. *Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.*

CIZMEK, L., & KOMORSKY-LOVRIC, S. (2019). Study of Electrochemical Behaviour of Carotenoids in Aqueous Media. *Electroanalysis*, 83–90.

COMPTON, R., BATCHELOR-MCAULEY, C., & DICKINSON, E. (2011). UNDERSTANDING VOLTAMMETRY: PROBLEM AND SOLUTIONS. *Imperial College Press*.

COMPTON, R., KUMAR, A., ZHANG, Y., & LI, D. (2020). A mini-review: How reliable is the drop casting technique? *Electrochemistry Communications*, 1-10.

COSTA, C., & CHAVEZ, M. (2005). EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS DAS SEMENTES DE *Bixa orellana* L.: UMA ALTERNATIVA PARA DISCIPLINAS EXPERIMENTAIS DE QUÍMICA ORGÂNICA. *Quim. Nova*, 28, 149-152.

CONSTANT, P., STRINGHETA, P., & DANDI, D. (2002). CORANTES ALIMENTÍCIOS. *B.CEPPA*, 20, 203-220.

CONSTANTINO, V., FERREIRA, A., LEROUX, F., PETRILLI, H., LIMA, F., COUTO, R., et al. (2020). Intercalation of Apocarotenoids from Annatto (*Bixa orellana* L.) into Layered Double Hydroxides. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2211-2223.

CONTRERAS-CALDÉRON, J., VÁZQUEZ, M., BLANDÓN-NARANJO, L., & HOYOS-ARBELÁEZ, J. (2018). Antioxidant capacity of mango fruit (*Mangifera indica*). An electrochemical study as an approach to the spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 435-440.

COSTA, W. (2012). OXIDAÇÃO ELETROCATALÍTICA DE HIDRAZINA EM MEIO ÁCIDO POR HEXACIANO FERRATO DE RUTÊNIO(III). 65 f. *Dissertação (Mestrado em Química)* - Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2012.

CURIE LABOUISSÉ, E. (2001). *Madame Curie: A Biography*. Illustrated, 2001. P.341.

DESMCZUK Jr, B., & RIBANI, R. (2015). Atualidades sobre a química e a utilização do urucum (*Bixa orellana* L.). *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos- REBRAPA*, 6, 37 – 50.

DIAS, M. (2010). ESTABILIDADE À RADIAÇÃO UV EM ESTAMPARIA DO CORANTE DE URUCUM ADSORVIDO EM ARGILA CAULIM. 125 f. *Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)* - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DOMÉNECH-CARBÓ, A., LABUDA, J., & SCHOLZ, F. (2013). ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY FOR THE ANALYSIS OF SOLIDS: CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION (IUPAC TECHNICAL REPORT). *Pure Appl. Chem.*, 609–631.

DOMÉNECH-CARBÓ, A., & DOMÍNGUEZ, I. (2015). Screening and authentication of tea varieties based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. *Sensors and Actuators B*, 491–499.

DOMÉNECH-CARBÓ, A., DOMÉNECH-CARBÓ, M., & SAURÍ-PERIS, M. (2005). Electrochemical identification of flavonoid dyes in solid work of art samples by abrasive voltammetry at paraffin-impregnated graphite electrodes. *Talanta*, 769–782.

DOMÉNECH-CARBÓ, M., & DOMÉNECH, A. (2006). Chronoamperometric study of proton transfer/electron transfer in solid state electrochemistry of organic dyes. *J Solid State Electrochem*, 949–958.

DOMÍNGUEZ, I., & DOMÉNECH-CARBÓ, A. (2015). Screening and authentication of tea varieties based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. *Sensors and Actuators*, 491–499.

DRAKE, K., & VAN DUYN, R. (1978). CYCLIC DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY: A VERSATILE INSTRUMENTAL APPROACH USING A COMPUTERIZED SYSTEM. *J. Electroanal. Chem.*, 231-246.

ESCARPA A., GONZÁLEZ, M., & BLASCO, A. (2004). "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal. *Analytica Chimica Acta*, 237-244.

ESCARPA, A., GONZÁLEZ, M., & BLASCO, A. (2004). Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 71-81.

EVANS, D., O'CONNELL, K., PETERSEN, R., & KELLY, M. (1983). CYCLIC VOLTAMMETRY. *Journal of Chemical Education*, 290-293.

FELIPE, L., & BICAS, L. (2017). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Quím. nova na escola*, Vol 39, nº 2, 120-130.

FERREIRA, A., BENEDITTI, A., RIBEIRO, S., FUGIVARA, C., CAIUT, M., & SARGENTELLI, V. (2011). ELETRODO DE PASTA DE CARBONO EM MINICAVIDADE DE CONTATO SÓLIDO. *Ecl. Quím.*, 1-22.

FOCSAN, A., PAN, S., & KISPERT, L. (2014). Electrochemical Study of Astaxanthin and Astaxanthin n-Octanoic Monoester and Diester: Tendency to Form Radicals. *The Journal of Physical Chemistry*, 2331-2339.

FRANCO, C., SILVA, F., FILHO, J., NETO, M., REBOUÇAS, A., REBOUÇAS, T., & FONTINÉLLI, I. (2008). *Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro*. Acesso em 13 de 09 de 2019, disponível em Infobibos-Informações Tecnológicas: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/UrucumTaxon/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/Index.htm)

GALLARDO-CABRERA, C., & ROJAS-BARAHONA, A. (2015). Stability study of an aqueous formulation of the Annatto dye. *International Food Research Journal*, 2149-2154.

GAO, M., SCULLY, A., & ZUO, C. (2021). Drop-Casting Method to Screen Ruddlesden-Popper Perovskite Formulations for Use in Solar Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 56217-56225.

GAO, Y., WEBB, S., & KISPERT, L. (2003). DEPROTONATION OF CAROTENOID RADICAL CATION AND FORMATION OF A DIDEHYDRODIMER. *J. Phys. Chem. B*, 13237-13240.

GARCIA, C., BOLOGNESI, V., DIAS, J., GOMES, O., & COSTA, C. (2012). Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*, 42, 1510-1517.

GLÓD, B., KIERSZTYN, I., & PISZCZ, P. (2014). TOTAL ANTIOXIDANT POTENTIAL ASSAY WITH CYCLIC VOLTAMMETRY AND/OR DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY MEASUREMENTS. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 24-29.

GLÓD, B., PISZCZ, P., CZAJKA, J., & ZARZYCKI, P. (2012). Evaluation of total antioxidant potential of selected biogenic polyamines, non-alcoholic drinks and alcoholic beverages using improved RP-HPLC assay involving fluorescence detection. *Food Chemistry*, 1026–1029.

GOLDSTEIN, E., & VAN DE MARK, M. (1982). ELECTRODE CLEANING AND ANION EFFECTS ON  $k_s$  FOR  $K_3Fe(CN)_6$  COUPLE. *Electrochimica Acta*, 1079-1085.

GOMES, C. (2015). DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE OURO MODIFICADOS COM CAMADAS AUTO-ARRANJADAS DE TIÓIS PARA FORMAÇÃO IN SITU DE NANO PARTICULAS DE OURO. 84 f. *Dissertação (Mestrado em Química)*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GRYGAR, T., MARKEN, F., SCHRÖDER, U., & SCHOLZ, F. (2002). ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF SOLIDS. A REVIEW. *Collect. Czech. Chem. Commun*, 163-208.

HAN, R.-M., TIAN, Y.-X., WU, Y.-S., WANG, P., AI, X.-C., ZHANG, J.-P., & SKIBSTED, L. (2006). MECHANISM OF RADICAL CATION FORMATION FROM THE EXCITED STATES OF ZEAXANTHIN AND ASTAXANTHIN IN CHLOROFORM. *Photochemistry and Photobiology*, 538-546.

HARDACRE, C., BRETT, D., RUSSELL, A., LIN, W.-F., & PUTHIYAPURA, V. (2018). Effect of Mass Transport on the Electrochemical Oxidation of Alcohols Over Electrodeposited Film and Carbon-Supported Pt Electrodes. *Topics in Catalysis*, 240–253.

HU, I., KARWEIK, D., & KUWANA, T. (1985). ACTIVATION AND DEACTIVATION OF GLASSY CARBON ELECTRODES. *J. Electroanal. Chem.*, 59-72.

KATIKAWONG, P., VEERASAI, W., & RATANA, T. (2009). Temperature dependence studies on the electro-oxidation of aliphatic alcohols with modified platinum electrodes. *J. Chem. Sci.*, 329–337.

KISPERS, L., DENG, G., KONOVALOV, V., JEEVARAJAN, A., JEEVARAJAN, J., & HAND, E. (1997). CAROTENOID RADICAL CATIONS, DICATIONS AND RADICAL TRICATIONS. *Acta Chemica Scandinavica*, 572-578.

KISPERS, L., & JEEVARAJAN, J. (1996). Electrochemical oxidation of carotenoids containing donor/acceptor substituents. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 57 -66.

KISPERS, L., GAO, Y., & LIU, D. (2000). Electrochemical properties of natural carotenoids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 140–150.

KISSINGER, P., & HEINEMAN, W. (1983). CYCLIC VOLTAMMETRY. *Journal of Chemical Education*, 702-706.

KOMORSKY-LOVRIĆ, S., & NOVAK, I. (2009). ESTIMATION OF ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF TEA LEAVES BY ABRASIVE STRIPPING ELECTROCHEMISTRY USING PARAFFIN-IMPREGNATED GRAPHITE ELECTRODE. *Collect. Czech. Chem. Commun*, 1467–1475.

KUBOTA, L., FREIRE, R., & CARVALHAL, R. (2005). Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation. *Electroanalysis*, 1251-1259.

LAI, S., KLEIJN, E., OZTURK, F., VAN REES VELLINGA, V., KONING, J., RODRIGUEZ, P., et al. (2010). Effects of electrolyte pH and composition on the ethanol electro-oxidation reaction. *Catalysis Today*, 92-104.

LEE, C.-G., UMEDA, M., & UCHIDA, I. (2006). Cyclic voltammetric analysis of C1–C4 alcohol electrooxidations with Pt/C and Pt–Ru/C microporous electrodes. *Journal of Power Sources*, 78–89.

LEMO, A. (2008). CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GENÓTIPOS DE URUCUEIROS (*Bixa orellana* L.). 69 f. *Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)*- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.

LIMA, R. (2005). AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E BIOLÓGICAS DAS SEMENTES DE URUCU c.v. CASCA VERDE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA MATUREZA FISIOLÓGICA. 97 f. *Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)* - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2005.

LIMA, R., MORENO, A., CASTRO, S., GONÇALVES, J., OLIVEIRA, A., & SAZAKI, J. (2006). Taninos Hidrolisáveis em *Bixa orellana* L. *Quim. Nova*, 29, 507-509.

LOURENÇO, M. (2004). ESTUDO DO MECANISMO DE ELETRO-OXIDAÇÃO DA MORINA. 31 f. *Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)*- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

LIU, D., GAO, Y., & KISPERS, L. (2000). ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF NATURAL CAROTENOIDS. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 140–150.

LUIZA, M. (2008). *Nosso Colorau, o Urucum*. Acesso em 13 de 09 de 2019, disponível em Overmundo: <http://www.overmundo.com.br/overblog/nosso-colorau-o-urucum>

MACÊDO, I., GARCIA, L., NETO, J., LEITE, K., FERREIRA, V., GHEDINI, P., et al. (2017). Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts. *Food Chemistry*, 326–331.

MAIRANOVSKY, V., ENGOVATOV, A., IOFFE, N., & SAMOKHVALOV, G. (1975). ELECTRON-DONOR AND ELECTRON-ACCEPTOR PROPERTIES OF CAROTENOIDS. *J. Electroanal. Chem.*, 123-137.

MAJIDI, S., JABBARI, A., HARI, H., & MOOSAVI-MOVAHEDI, A. (2007). Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a nickel–curcumin complex modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 4622–4629.

MARI. (2018). *O plantio das mudas de Urucum (Açafrão) será feita esta semana nas áreas do agricultores familiares e produtores rurais*. Acesso em 13 de 09 de 2019, disponível em Governo Municipal de MARI: <http://www.mari.pb.gov.br/o-plantio-das-mudas-de-urucum-acafrao-sera-feita-esta-semana-nas-areas-do-agricultores-familiares-e-produtores-rurais/>

MARKEN, F., NEUDECK, A., & BOND, A. (2010). CYCLIC VOLTAMMETRY. *Electroanalytical Methods*, 57-106.

MARTINS DE SÁ, L. (2013). Determinação eletroanalítica e espectrofotométrica da atividade antioxidante de fermentados de jabuticaba e vinhos de diferentes procedências. 98 f. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)* - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

MERCADANTE, A., & PFANDER, H. (2001). CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO CAROTENÓIDE MINORITÁRIO DE URUCUM. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 21, 193-196.

MERCADANTE, A., STECK, A., & PFANDER, G. (1999). Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *Phytochemistry*, 52, 135-139.

MERCADANTE, A., STECK, A., & PFANDER, H. (1997). Isolation and Identification of New Apocarotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1050–1054.

MERCADANTE, A., STECK, A., RODRIGUEZ-AMAY, D., PFANDER, H., & BRITTON, G. (1996). ISOLATION OF METHYL 9'Z-APO-6'-LYCOPENOATE FROM BIXA ORELLANA. *Phytochemistry*, 4, 1201-1203.

MERCADANTE, A., STECK, A., & PFANDER, G. (1997). ISOLATION AND STRUCTURE ELUCIDATION OF MINOR CAROTENOIDS FROM ANNATTO (*BIXA ORELLANA* L.) SEEDS. *Phytochemistry*, 8, 1379-1383.

MESQUITA, S., TEIXEIRA, C., & SERVULO, E. (2017). Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. *Rev. Virtual Quim.*, 9, 672-688.

MILICEVIC, A., MILETIC, G., & JOVANOVIC, N. (2019). Electrochemical oxidation of flavonoids: PM6 and DFT for elucidating electronic changes and modelling oxidation potential (part II). *Journal of Molecular Liquids*, 1-8.

MOUCHREK-FILHO, V., CHIERICE, G., & MARQUES, A. (1999). ESTUDO VOLTAMÉTRICO DO COMPLEXO DE COBRE(II) COM O LIGANTE VERMELHO DE ALIZARINA S, ADSORVIDO NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE GRAFITE PIROLÍTICO. *QUÍMICA NOVA*, 31-315.

MUNOZ, R., RICHTER, E., MONTES, R., TORMIN, T., & OLIVEIRA, G. (2016). Electrochemical Oxidation of Astaxanthin on Glassycarbon Electrode and its Amperometric Determination Using Batch Injection Analysis (BIA). *Electroanalysis*, 1-7.

NAJAR, S., BOBBIO, S., & BOBBIO, P. (1998). Effects of Light, Air, Anti-oxidants and Pro-oxidants on Annatto Extracts (Bixa orellana). *Food Chemistry*, 29, 283-289.

OLIVEIRA, A. (2022). AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO TANINO VEGETAL DA ACÁCIA NEGRA EM MATRIZES POLIMÉRICAS DE POLIESTIRENO APÓS PROCESSO DE ENVELHECIMENTO ACELERADO. 100 f. *Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais)* - Universidade de São Carlos, Sorocaba, 2022.

OLIVEIRA, G., TORMIN, T., MONTES, R., RICHTER, E., & MUNOZ, R. (2016). Electrochemical Oxidation of Astaxanthin on Glassycarbon Electrode and its Amperometric Determination Using Batch Injection Analysis (BIA). *Electroanalysis*, 1-7.

OLIVEIRA, J. (2005). CARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE COMPOSTOS DE URUCUM (Bixa orellana L.). 215 f. *Tese (Doutorado em Engenharia Química)*- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, L., EDWARDS, H., COSTA, L., ARVELLOS, J., OLIVEIRA, V., RIMULO, I., et al. (2020). Understanding Solvent/Bixin Interactions by Raman Spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc*, 1370-1382.

OLIVEIRA-BRETT, A., PIEDADE, J., SILVA, L., & DICULESCU, V. (2004). Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry*, 321-329.

PACHECO, W., SAMAN, F., ALMEIDA, V., RITA, A., & AUCÉLIO, R. (2013). Voltamétricas: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Rev. Virtual Quim*, 5, 516-537.

PALLESCHI, G., TERRANOVA, M., ORLANDUCCI, S., AMINE, A., & VALENTINI, F. (2003). Carbon Nanotube Purification: Preparation and Characterization of Carbon Nanotube Paste Electrodes. *Anal. Chem*, 5413-5421.

PANZER, R., & ELVING, P. (1975). NATURE OF THE SURFACE COMPOUNDS AND REACTIONS OBSERVED ON GRAPHITE ELECTRODES. *Electrochimica Acta*, 635-647.

PARK, S.-M. (1978). ELECTROCHEMICAL STUDIES OF  $\beta$ -CAROTENE, ALL-TRANS-RETINAL AND ALL-TRANS-RETINOL IN TETRAHYDROFURAN. *J. Electrochem. Soc.*, 216-222.

PAVIA, D., LAMPMAN, G., KRIZ, G., & VYVYAN, J. (2015). *INTRODUÇÃO A ESPECTROSCOPIA* (5<sup>o</sup> ed.). CENGAGE Learning.

PAVINATTO, A., SOARES, A., & TORRES, B. (2022). Filmes drop-casting e dip-coating. *Nanotecnologia aplicada a polímeros*, pp. 1-24.

PEIXOTO, C., FRAGA, S., JUSTIM, J., GOMES, M., CARVALHO, D., JARENKOW, J., et al. (2017). Voltammetric determination of total antioxidant capacity of *Bunchosia glandulifera* tree extracts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 326-331.

PIELA, B., & WRONA, P. (1995). Capacitance of the gold electrode in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution: a.c. impedance studies. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 69-79.

PIMENTEL, F., & STRINGHETA, P. (1999). PRODUÇÃO DE CORANTES DE URUCUM EM PÓ, POR MEIO DE PRECIPITAÇÃO ÁCIDA, A PARTIR DE EXTRATOS OBTIDOS EM DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRATORAS. *Rev. Bras. Cor. Nat.*, 3, 53-57.

PIRES, M. (2018). Enriquecimento de norbixina por processos físico-químicos a partir de bixina de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana in vitro. *Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)* - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

PRESTO, H., & RICKARD, M. (1980). EXTRACTION AND CHEMISTRY OF ANNATTO. *Food Chemistry*, 47-56.

RAO, D., SATYANARAYANA, A., PRABHAKARA RAO, P., & BALASWAM, K. (2006). Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 952-956.

RAYMUNDO, M. (2007). AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE NITRITOS E ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS. 215f. *Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)*- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

REIS, N., SERRANO, S., MENEGHATTI, R., & GIL, E. (2009). Métodos Eletroquímicos usados para Avaliação da Atividade Antioxidante de Produtos Naturais. *Latin American Journal of Pharmacy*, 949-953.

REITH, J., & GIELEN, J. (1971). PROPERTIES OF BIXIN AND NORBIXIN AND THE COMPOSITION OF ANNATTO EXTRACTS. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 861-864.

SAITO, Y., & KIKUCHI, T. (2013). *VOLTAMMETRY: THEORY, TYPES AND APPLICATIONS*. NOVA.

SALUSTIANO, R. (2019). Metodologia de Baixo Custo para a avaliação do comportamento de envelhecimento de isoladores poliméricos. 136 f. *Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica)* - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2019.

SANTOS, N. (2013). EXTRAÇÃO DO PIGMENTO DAS SEMENTES DE URUCUM (Bixa orellana L.). 51 f. *Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química)*- Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, São Paulo, 2013.

SCOTTER, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives and Contaminants*, 26, 1123–1145.

SAMOKHVALOV, G., IOFFE, N., ENGOVATOV, A., & AIRANOVSKY, V. (1975). ELECTRON-DONOR AND ELECTRON-ACCEPTOR PROPERTIES OF CAROTENOIDS. *J. Electroanal. Chem.*, 123--137.

SAVÉANT, J., KONOVALOV, V., KISPERT, L., & HAPIOT, P. (2001). Single Two-Electron Transfers vs Successive One-Electron Transfers in Polyconjugated Systems Illustrated by the Electrochemical Oxidation and Reduction of Carotenoids. *J. Am. Chem. Soc.*, 6669-6677.

SCHMIFT, V., IANNELLO, R., PASTOR, E., & GONZÉLEZ, S. (1996). Electrochemical Reactivity of Ethanol on Porous Pt and PtRu: Oxidation/Reduction Reactions in 1 M HClO<sub>4</sub>. *J. Phys. Chem.*, 17901-17908.

SCHOLZ, F., MAHON, P., MYLAND, J., OLDHAM, K., & SCHRODER, U. (2000). Modelling of solid state voltammetry of immobilized microcrystals assuming an initiation of the electrochemical reaction at a three-phase junction. *J Solid State Electrochem*, 314-324.

SCHULZ, H., BARANSKA, M., & BARANSKI, R. (2005). Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoid Analysis. *Biopolymers*, 212–221.

SCOTTER, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives and Contaminants*, 1123–1145.

SCOTTER, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives and Contaminants*, 1123–1145.

SDBS N° 10569. (2022). *Spectral Database for Organic Compounds SDBS*. Acesso em 12 de 01 de 2022, disponível em [https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)

SDBS N° 5131. (2022). *Spectral Database for Organic Compounds SDBS*. Acesso em 12 de 01 de 2022, disponível em [https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)

SILVA, P. (2007). MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIXINA E NORBIXINA EM SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.). 159 f. *Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos; Tecnologia de Alimentos; Engenharia de Alimentos)* - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SILVA, P., NACHTIGALL, A., & STRINGHETA, P. (2009). FATORES QUE INFLUENCIAM A REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO DOS CAROTENÓIDES PRESENTES NO URUCUM (*Bixa orellana* L.). *Ciênc. agrotec., Lavras*, 1892-1897.

SILVA, R. (2006). Preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados com ditiocarbamatos para análise de fármacos. 96 f. *Dissertação (Mestrado em Química)*. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006 .

SILVEIRA, G., TURO, F., & SILVA, J. (2020). ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF ORGANIC COMPOUNDS IN SOLID-STATE: APPLICATIONS OF VOLTAMMETRY OF IMMOBILIZED MICROPARTICLES IN BIOANALYSIS AND CULTURAL HERITAGE SCIENCE. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2633–2652.

SKALTSOUNIS, A., TROUGAKOS, L., ALIGIANNIS, N., & ARGYROPOULOU, A. (2013). Natural compounds with anti-ageing activity. *The Royal Society of Chemistry*, 1-26.

SMITH, E. (2006). Examination of  $n = 2$  reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials. *Analytica Chimica Acta*, 259–264.

SOUZA GIL , E., ROCHA, M., BENJAMIN, S., REIS, C., REZENDE, S., & OLIVEIRA-NETO, J. (2016). Electrochemical behavior and determination of major phenolic. *Food Chemistry*, 506-512.

SOUSA, R., LIRA, C., RODRIGUES, A., MORAES, S., QUEIROZ, C., CHANG, R., OLIVEIRA, A. (2014). ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE ORA-PRONÓBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) USANDO MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS E VOLTAMÉTRICOS IN VITRO. *Biosci. J.*, 448-457.

SRINIVASAN, R., SAIBI, R., & MEETHAL, R. (2022). Hydrogen evolution reaction on polycrystalline Au inverted rotating disc electrode in HClO<sub>4</sub> and NaOH solutions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 14304-14318.

TAY-AGBOZO, S., STREET, S., & KISPERS, L. (2018). The carotenoid Bixin found to exhibit the highest measured carotenoid oxidation potential to date consistent with its

practical protective use in cosmetics, drugs and food. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, 1-8.

TORRES, B., SOARES, A., & PAVINATTO, A. (2022). FILMES DROP-CASTING E DIP-COATING. *Nanotecnologia aplicada a polímeros*, 304-326.

TREMILIOSI-FILHO, G., GONZALEZ, E., MOTHEO, A., BELGSIR, E., LÉGER, J.-M., & LAMY, C. (1998). Electro-oxidation of ethanol on gold: analysis of the reaction products and mechanism. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 31-39.

TRIGUEIRO NETO, O. (2018). IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES EM VEGETAIS, IN-NATURA, UTILIZANDO ESPECTROSCÓPIA FOTOACÚSTICA. 71 f. *Dissertação (Mestrado em Física)* – Programa de Pós-Graduação em Física, Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2018.

VAN DER LINDEN, W., & DIEKER, J. (1980). GLASSY CAR-BON AS ELECTRODE MATERIAL IN ELECTRO-ANALYTICAL CHEMISTRY. *Analytica Chimica Acta*, 1-24.

VERISSÍMO, S. (2003). EXTRAÇÃO CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO CORANTE DO URUCUM (*Bixa orellana* L.) NO TINGIMENTO DE FIBRAS NATURAIS. 99 f. *Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais)* - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.

WITHNALL, R., CHOWDHRY, B., SILVER, J., EDWARDS, H., & OLIVEIRA, L. (2003). Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part A*, 2207-2212.

WOLYNEC, S. (2013). *Técnicas Eletroquímicas em Corrosão*. São Paulo: Edusp.

ZAK, J., & KUWANA, T. (1982). Electrooxidative Catalysis Using Dispersed Alumina on Glassy Carbon Surfaces. *J. Am. Chem. SOC.*, 5514-5515.

ZAK, J., & KUWANA, T. (1983). CHEMICALLY MODIFIED ELECTRODES AND ELECTROCATALYSIS. *J. Electroanal. Chem.*, 645-664.

ZAMARCHI, F. (2019). ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM POLIETILENOIMINA PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO. 47f. Relatório de Estágio (Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

ZARE, H., CHATRAEI, F., & NASIRIZADEH, N. (2010). Differential Pulse Voltammetric Determination of Hydroxylamine at an Indenedione Derivative Electrodeposited on a Multi-Wall Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode. *J. Braz. Chem. Soc*, 1977-1985.

ZARE, H., SOBHANI, Z., & MAZLOUM-ARDAKANI, M. (2007). Electrocatalytic oxidation of hydroxylamine at a rutin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode: Improvement of the catalytic activity. *Sensors and Actuators B*, 641–647.

ZIMA, J., BAREK, J., VYTRAS, K., & SVANCARA, I. (2003). Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis-Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 311–345.