

# Determinação de Ácido Ascórbico em Sucos de Caixinha Longa Vida por Voltametria Cíclica Usando os Métodos dos Padrões Externos e da Adição de Padrão: Uma Proposta de Experimento para o Ensino de Química Analítica Instrumental

## *Determination of Ascorbic Acid in Long Life Juices by Cyclic Voltammetry Using External Standards and Standard Addition Methods: An Experimental Proposal for Teaching Analytical Instrumental Chemistry*

Vinicius N. Silveira,<sup>a</sup> Nayara Caroline M. Carvalho,<sup>a</sup> Jéssica A. Oliveira,<sup>a</sup> Luís Antônio da Silva,<sup>a</sup> Valéria A. Alves<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação, Departamento de Química, Unidade 3 da Univerdecidade, CEP 38064-200, Uberaba-MG, Brasil.

\*E-mail: [valeria.alves@uftrm.edu.br](mailto:valeria.alves@uftrm.edu.br)

Recebido em: 26 de Agosto de 2021

Aceito em: 22 de Dezembro de 2021

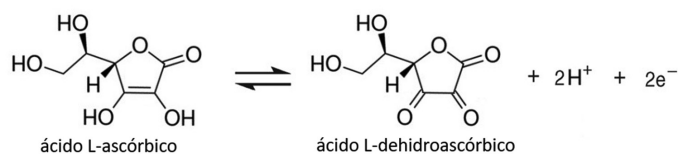
Publicado online: 1 de Abril de 2022

Ascorbic acid (vitamin C) is essential to our body and can be found in leafy vegetables, legumes and fruits, as well as in natural and industrialized juices. The concentration of vitamin C present in long life juices is normally informed by the manufacturer on the package label. The objective of this work was to use an electroanalytical technique, cyclic voltammetry, to determine the concentration of vitamin C in long-life juices. From the dilution of a 100 mmol L<sup>-1</sup> stock solution of ascorbic acid, the calibration curves were prepared by the method of external standards or of standard addition. Cyclic voltammograms (CVs) were recorded from 0 to +1.0 V, with  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . The solutions were prepared in the presence of KCl 0.34 mol L<sup>-1</sup> as supporting electrolyte, including the samples. Measurements were taken in triplicate. It was found that vitamin C is present in all juice brands analyzed, and in some cases in a concentration very different from the value informed on the package label by the manufacturer. The present work showed the viability of using the CV technique for the determination of vitamin C in a food product, which is relevant for the teaching of electrochemistry.

**Keywords:** Cyclic voltammetry; ascorbic acid; vitamin C.

## 1. Introdução

A vitamina C ou ácido ascórbico (AA), possui fórmula química (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) é amplamente utilizada como antioxidante, nas indústrias farmacêutica, química, cosmética e alimentícia.<sup>1</sup> É um composto solúvel em água e desempenha um papel essencial nos processos biológicos e no metabolismo, incluindo a absorção de ferro.<sup>2-4</sup> Encontra-se naturalmente presente em muitas frutas e vegetais, como laranja, limão, abacaxi, caju, espinafre, e tomate.<sup>5</sup> O AA pode ser encontrado como ácido L-ascórbico, na forma reduzida e ácido L-dehidroascórbico, na forma oxidada (onde este perde dois átomos de hidrogênio). A semi-reação associada às formas reduzida e oxidada do AA possui  $E^\circ = +0,390 \text{ V}$ ,<sup>6</sup> e pode ser observada na Figura 1.



**Figura 1.** Semi-reação de oxidação do ácido ascórbico (vitamina C)

A vitamina C é sintetizada por uma variedade de organismos do reino animal e vegetal. No entanto, humanos, outros animais primatas e roedores, não produzem esta vitamina.<sup>7</sup> O AA é um constituinte comum da dieta humana e comercializado como suplemento (vitamina C) em níveis elevados, já que sua ingestão é indicada para a prevenção e o tratamento de várias patologias.<sup>8</sup> Suplementos alimentares de vitamina C vendidos em farmácias sem receita médica, como por exemplo na forma de comprimidos efervescentes podem conter 1 g de vitamina C por

comprimido. No entanto, há situações onde doses elevadas dessa vitamina, como 4 g ao dia, causam a destruição dos glóbulos vermelhos do sangue de paciente portador de deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase eritrocitária. Níveis bem menores, como 100 mg de vitamina C ao dia, são tolerados por pacientes sob diálise, devido ao risco de formação de cálculos urinários.<sup>9</sup>

A insuficiência de vitamina C causa o escorbuto e a anemia, e está associada a algumas anormalidades psicológicas (depressão). Em contraste, o excesso de vitamina C afeta a absorção de vitamina B12, também relacionada à anemia, e pode causar distúrbios gastrointestinais, cálculo renal e excesso de absorção de ferro.<sup>2,10</sup> Além disso, a ingestão excessiva de vitamina C pode causar obesidade.<sup>11</sup>

Assim, os humanos devem ingerir vitamina C para sobreviver.<sup>12</sup> Uma ingestão diária de vitamina C (45 mg / dia para um adulto) é necessária.<sup>13</sup> Portanto, para controlar a ingestão diária da vitamina C, a determinação quantitativa de seu conteúdo em frutas e vegetais é crucial.<sup>14</sup> A determinação de AA é necessária para o controle de qualidade de diferentes produtos.

O método recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para determinação do AA em alimentos é baseado na volumetria de óxido-redução, utilizando-se o iodato de potássio.<sup>15</sup>

De acordo com o Artigo 18 do Decreto nº 6.871 de 04 de Junho de 2009,<sup>16</sup> podem ser chamadas de sucos as bebidas não fermentadas, não concentradas e não diluídas, destinadas ao consumo, obtidas de frutas sadias e maduras, ou de vegetais. Também podem ser reconstituídos pela diluição de suco concentrado ou desidratado, porém de modo a manter a concentração original do suco integral ou ao teor mínimo de sólidos solúveis estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar na sua rotulagem a origem do suco utilizado para sua elaboração, se concentrado ou desidratado.<sup>17</sup>

A declaração do ácido ascórbico na rotulagem é voluntária, embora esteja presente em grande parte dos sucos industrializados, notadamente naqueles com base em frutas cítricas,<sup>17</sup> cujos produtos podem ser considerados de alto conteúdo naquele nutriente (mínimo de 30% da Ingestão Diária Recomendada – IDR) ou como fonte de vitamina C (mínimo de 15% da IDR).<sup>18</sup>

Há regulamentação vigente que estabelece os valores mínimos de ácido ascórbico (em mg/100 g) para alguns sucos, cujos valores dependem do sabor do suco. Para o suco de abacaxi é estabelecido o valor máximo de 21,5 mg/100 g.<sup>19</sup>

A vitamina C é bastante sensível ao processamento e armazenamento de produtos, sendo a sua retenção considerada um índice de conservação e da qualidade nutricional dos mesmos. Dada a sua enorme relevância e vasta aplicação, vários métodos foram desenvolvidos para sua determinação em diversos tipos de amostras (p. ex.: alimentos, bebidas, amostras biológicas, produtos

farmacêuticos, etc)<sup>20</sup>. Os métodos mais utilizados são os físico-químicos, dentre os quais estão os volumétricos e os espectrofotométricos.<sup>20</sup> Recentemente, Hoehne e Marmitt<sup>20</sup> discutiram esses métodos de quantificação de AA em diferentes tipos de amostras, com ênfase nos seus princípios, interferentes, vantagens e desvantagens.

Os métodos volumétricos, devido à falta de especificidade, são úteis apenas na análise de amostras que não contenham outros compostos redutores (além do ácido ascórbico). O método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), baseado na titulação de ácido ascórbico com 2,6-dicloroindofenol em solução ácida, não é aplicável em todas as matrizes.<sup>21</sup> Podem ser encontrados concentrações maiores do que as reais, devido à presença de substâncias naturalmente presentes nas frutas, como taninos, betaninas, compostos de sulfidril, Fe (II), Mn (II) e Co (II), e que podem ser oxidadas pelo corante.<sup>22</sup> Além dos métodos volumétricos e espectrofotométricos, encontram aplicação os métodos eletroquímicos, luminescentes, fluorimétricos e cromatográficos.<sup>20</sup>

O presente trabalho utilizou a técnica de voltametria cíclica, VC, para determinar a concentração de ácido ascórbico (vitamina C) em produtos alimentícios (sucos de caixinha ou longa vida), encontrados no comércio da cidade de Uberaba/ Minas Gerais. Com isso, pretende-se contribuir com uma proposta de atividade experimental para a determinação de ácido ascórbico em amostras reais, com ênfase no uso dos métodos do padrão externo e da adição de padrão. Espera-se com essa abordagem mostrar a aplicabilidade da VC num produto do cotidiano dos estudantes. Muitas vezes, os métodos do padrão externo e da adição de padrão são discutidos apenas conceitualmente nas aulas teóricas de Química Analítica Instrumental, e são resolvidos exercícios, mas é importante a sua contextualização, visando tornar o formalismo matemático envolvido menos abstrato, bem como disseminar o uso da eletroanálise nos cursos de graduação. Apesar das suas vantagens, como alta sensibilidade e baixo custo, há resistência a um maior uso por parte dos analistas, o que pode estar relacionado ao fato da sua teoria básica ser considerada difícil e abrangente.<sup>23</sup>

Os referenciais para o desenvolvimento da presente proposta de atividade experimental são de autores estrangeiros,<sup>6,24,25</sup> ou seja, há escassez de trabalhos sobre o assunto na língua portuguesa, para fins didáticos no ensino superior. Ressalta-se que, visando contribuir com uma conscientização dos estudantes com relação à preocupação com o meio ambiente nas suas atitudes, dentro ou fora da academia, o sistema eletroquímico foi miniaturizado em relação a outros estudos eletroquímicos na literatura, que utilizam um volume vinte vezes maior de amostra, ou seja, 100 mL de amostra, contra 5 mL no presente trabalho, o que demandou um menor consumo de reagentes e, conseqüentemente, uma produção de menor quantidade de resíduos. Também é importante mencionar que o sinal analítico não foi afetado pelo volume de solução utilizado.

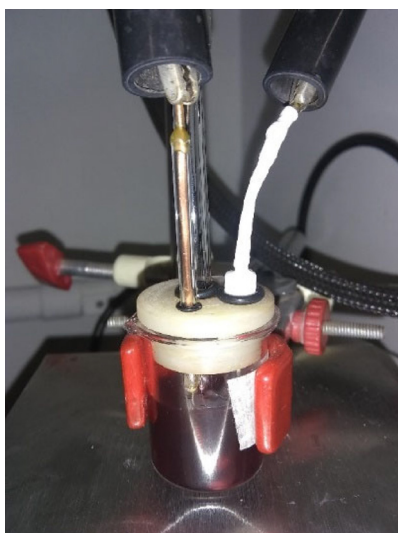
Aos leitores interessados na fundamentação das técnicas voltamétricas, Pacheco e colaboradores<sup>23</sup> publicaram uma revisão sobre os conceitos envolvidos na voltametria de varredura linear, voltametria cíclica, técnicas de pulso (voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada), voltametria de redissolução e voltametria adsortiva de redissolução. Também, recomenda-se o artigo de Elgrishi e colaboradores<sup>26</sup>, para aqueles que pretendem iniciar na técnica de voltametria cíclica, e de Paiola e colaboradores<sup>27</sup>, o qual descreve o desenvolvimento de uma célula eletroquímica miniaturizada para ser utilizada em experimentos didáticos envolvendo voltametria cíclica, em cursos de graduação, aplica os conceitos da Química Analítica Verde e proporciona o aprendizado de conceitos de eletroquímica e química analítica.

## 2. Experimental

### 2.1. Equipamentos, célula eletroquímica e condições voltamétricas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Metrohm Autolab, modelo PGSTAT10 (Herisau, Suíça), interfaciado a um programa de computador (GPES). Os volumes das soluções foram medidos usando micropipetas de 1000  $\mu\text{L}$  (MDI) e de 5000  $\mu\text{L}$  (Peguepet<sup>®</sup>). Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura obtida com purificador da Gehaka (Master System/MS2000).

A célula eletroquímica utilizada nos experimentos, com os respectivos eletrodos, é apresentada na Figura 2. Utilizou-se um disco de platina de 1 mm de diâmetro, área 0,78  $\text{mm}^2$  como eletrodo de trabalho (Microquímica<sup>®</sup>), um eletrodo de referência de Prata/Cloreto de Prata 3,0  $\text{mol L}^{-1}$  de NaCl, saturado com AgCl (Bioanalytical Systems, RE-



**Figura 2.** Célula eletroquímica munida dos eletrodos de trabalho, de referência e auxiliar. Amostra analisada: suco de uva. Eletrólito de suporte:  $\text{KCl } 0,34 \text{ mol L}^{-1}$

4, MF2021) e como eletrodo auxiliar um fio de platina de 0,5 mm em espiral (Goodfellow<sup>®</sup>).

Poliu-se o eletrodo de trabalho manualmente, antes de cada medida eletroquímica, fazendo-se um movimento em forma de oito sobre um pedaço de tecido macio (veludo), contendo duas gotas de suspensão de alumina 0,3  $\mu\text{m}$  da Fortel Indústria e Comércio Ltda. (Casa Verde, São Paulo). Após o polimento na presença de alumina, repetiu-se o polimento sobre outro pedaço de veludo, na ausência de alumina, para remover o excesso de partículas de alumina. Por fim, o eletrodo foi lavado com água ultrapura e seco com papel macio.

Registrou-se os voltamogramas cíclicos, VCs, do ES, das soluções padrão e das amostras nas seguintes condições voltamétricas: velocidade de varredura do potencial,  $v$ , 50  $\text{mV s}^{-1}$  e faixa de potencial,  $E$ , de 0 a +1,0 V.

### 2.2. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: ácido ascórbico,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , 99,0 % (176,12  $\text{g mol}^{-1}$ ), da Êxodo Científica (Hortolândia-SP, Brasil); cloreto de potássio, KCl, 99% (74,56  $\text{g mol}^{-1}$ ), da Vetec (Duque de Caxias-RJ, Brasil); amido solúvel da Synth (Diadema-SP, Brasil); iodeto de potássio, KI, 99,00 %, (166,00  $\text{g mol}^{-1}$ ), da Êxodo Científica (Hortolândia-SP, Brasil); ácido sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95-98% (98,08  $\text{g mol}^{-1}$ ), da Neon (São Paulo-SP, Brasil); e iodato de potássio,  $\text{KIO}_3$ , 99,4 % (214,00  $\text{g mol}^{-1}$ ), da Êxodo Científica (Hortolândia-SP, Brasil).

### 2.3. Soluções e amostras

Neste experimento, o ácido ascórbico foi determinado em sucos longa vida por voltametria cíclica, utilizando os métodos do padrão externo e da adição de padrão. Esta prática de ensino necessitou de uma solução estoque de ácido ascórbico 0,10  $\text{mol L}^{-1}$  e de uma solução de KCl 0,34  $\text{mol L}^{-1}$ , que atua como eletrólito de suporte, ES.

Para a preparação de 25,00mL de solução estoque de ácido ascórbico 0,10  $\text{mol L}^{-1}$  pesou-se uma massa de ácido ascórbico igual a 0,4403 g, transferiu-se para um balão volumétrico. Pesou-se 0,6338 g de KCl e transferiu-se para o mesmo balão volumétrico, para tornar a solução 0,34  $\text{mol L}^{-1}$  em KCl. Completou-se o volume do balão com água ultrapura, até a sua marca de calibração.

Para a preparação de 250,00 mL de uma solução de KCl 0,34  $\text{mol L}^{-1}$  pesou-se uma massa de KCl igual a 6,3376 g e transferiu-se para um balão volumétrico. Completou-se o volume do balão volumétrico com água ultrapura, até a sua marca de calibração.

Foram analisados 11 sucos longa vida, de 6 marcas diferentes, representadas por números (1, 2, 3, 4, 5 e 6), e 5 sabores (laranja, maçã, goiaba, pêssego e uva). A Tabela 1 apresenta os sucos analisados e os respectivos códigos. Vale ressaltar que duas marcas referem-se à versão *kids* do suco.

**Tabela 1.** Sucos analisados nesse trabalho e respectivos códigos

Suco	Código*	Suco	Código*
1	Laranja-1	7	Uva-4b
2	Laranja-2	8	Uva-4c (versão kids)
3	Maçã-3	9	Uva-4d (versão kids)
4	Goiaba-1	10	Uva-5
5	Pêssego-4	11	Uva-6 (versão kids)
6	Uva-4a		

\*Formado pelo sabor do suco e um número. O número refere-se a uma dada marca. No caso dos sucos Uva-4 e Uva-4 (versão kids), as letras a, b e c, d referem-se a sucos de mesmo sabor e marca, porém de lotes diferentes.

Todas as soluções de ácido ascórbico foram preparadas imediatamente antes do uso e guardadas ao abrigo da luz durante a execução dos experimentos, para evitar a degradação do ácido ascórbico. As embalagens de suco foram abertas imediatamente antes do uso, pelo mesmo motivo.

#### 2.4. Determinação de ácido ascórbico nas amostras de suco longa vida por voltametria cíclica

**Método do padrão externo:** preparou-se nove soluções padrão, transferindo-se os seguintes volumes da solução estoque de ácido ascórbico  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ : 130  $\mu\text{L}$ ; 190  $\mu\text{L}$ ; 250  $\mu\text{L}$ ; 380  $\mu\text{L}$ ; 500  $\mu\text{L}$ ; 1000  $\mu\text{L}$ ; 1500  $\mu\text{L}$ ; 2000  $\mu\text{L}$  e 2500  $\mu\text{L}$  para balões volumétricos de 25 mL, numerados de 1 a 9. Completou-se o volume dos balões volumétricos com solução de KCl  $0,34 \text{ mol L}^{-1}$ , até a marca de calibração. Preparou-se as amostras de suco, transferindo-se 5000  $\mu\text{L}$  de suco para um béquer de 10 mL, já contendo 0,1267 g de KCl. Preparou-se cada amostra em triplicata.

**Método da adição de padrão (adições sucessivas):** foram realizadas duas adições sucessivas de 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de ácido ascórbico  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  a 5,00 mL de amostra.

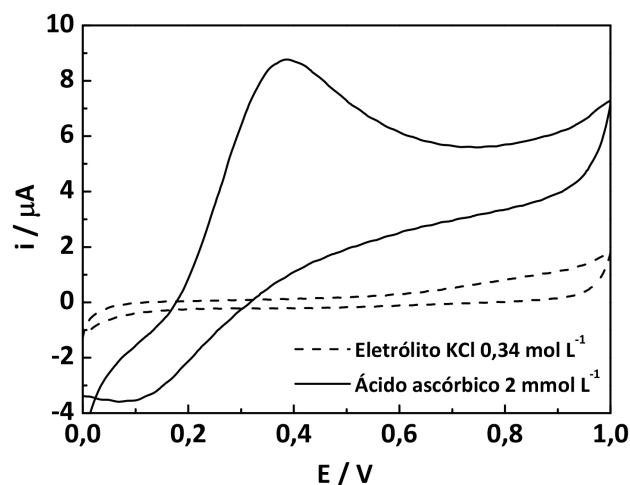
Para ambos os métodos, realizou-se o tratamento dos dados subtraindo-se a corrente do ES dos voltamogramas dos padrões e das amostras, e mediu-se os valores de corrente de pico anódica (corrente máxima). Construiu-se as curvas de calibração e obteve-se as curvas analíticas. Por fim, calculou-se a concentração do ácido ascórbico, em  $\text{mmol L}^{-1}$ , nas amostras. Para comparar com o valor do rótulo do suco analisado, converteu-se a concentração do ácido ascórbico no suco para  $\text{mg L}^{-1}$ , multiplicando-se a concentração em  $\text{mmol L}^{-1}$  pela massa molar do ácido ascórbico,  $176,12 \text{ g mol}^{-1}$ . Calculou-se o Erro Relativo,  $E_r$ , e o Desvio Padrão Relativo,  $s_r$ , dos resultados.

### 3. Resultados e Discussão

Quando nenhuma espécie eletroativa é adicionada à solução eletrolítica, os voltamogramas cíclicos exibiram o perfil mostrado na Figura 3 (linha tracejada). Uma pequena

corrente flui entre os eletrodos; esta corrente de fundo é chamada de corrente capacitiva (devido ao carregamento da camada dupla elétrica) ou de corrente não faradaica. Esse VC da solução do ES é essencial para testar se todos os componentes da célula eletroquímica estão em boas condições antes de registrar o VC na presença do analito (linha contínua), ou seja, das soluções padrão ou da amostra.<sup>26</sup>

Além disso, o VC do ES deve ser subtraído do VC das soluções padrão ou da amostra, pelo próprio programa de computador que monitora o potenciostato, e posteriormente determina a altura do pico. Nesse caso, a altura do pico refere-se à corrente de oxidação do ácido ascórbico, em  $\mu\text{A}$ .



**Figura 3.** Voltamogramas cíclicos de uma solução ácido ascórbico e do eletrólito de suporte

#### 3.1. Método do padrão externo

A Figura 4 apresenta os voltamogramas cíclicos das soluções padrão de ácido ascórbico e a curva de calibração obtida, a partir do tratamento dos VCs dos padrões de ácido ascórbico, onde cada nível de concentração foi realizado em triplicata (método do padrão externo). Observa-se um pico de oxidação do ácido ascórbico, num potencial de aproximadamente 0,4 V, onde ocorre a semi-reação anódica apresentada na Figura 1.<sup>6</sup>

No intervalo de concentrações testadas, 0,52 a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , observou-se a linearidade do método analítico, cujo valor de coeficiente de correlação ( $r$ ) foi de 0,9923. A equação da curva analítica, obtida pelo método dos mínimos quadrados, é dada por  $y = -0,22348 + 3,80285x$ . O valor de  $r$  é maior que o valor mínimo aceito para um método ser considerado linear, que é 0,990.<sup>28</sup> Portanto o método pode ser considerado linear na faixa de concentrações investigada.

A Figura 5 apresenta os voltamogramas cíclicos de alguns sucos analisados, como Laranja-2, Goiaba-1, Pêssego-4 e Uva-6 (versão kids). A Tabela 1S (ver Material Suplementar) apresenta os dados obtidos experimentalmente para os sucos analisados, pelo método do padrão externo.

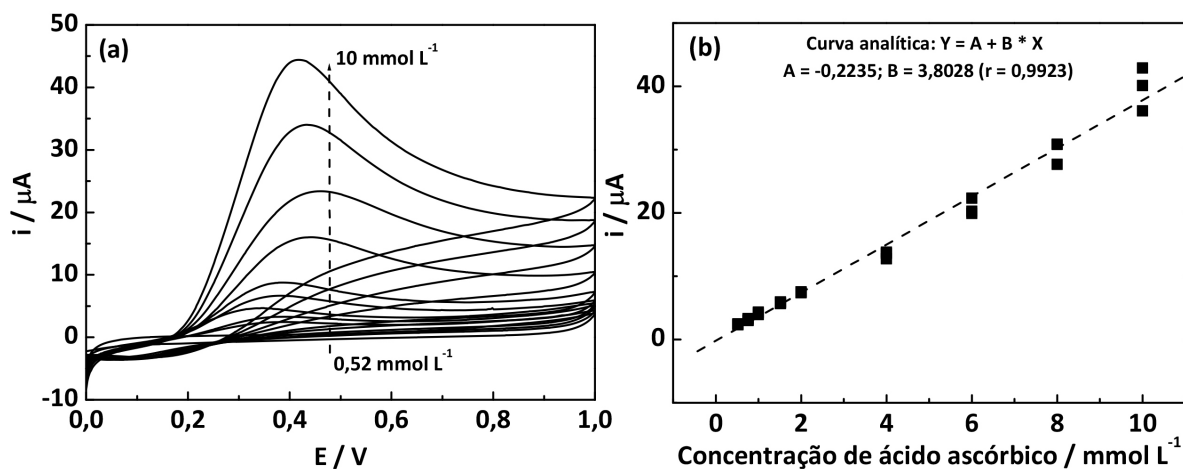


Figura 4. (a) Voltamogramas cíclicos das soluções padrão de ácido ascórbico. (b) Curva de calibração (corrente em função da concentração de ácido ascórbico). Método do padrão externo

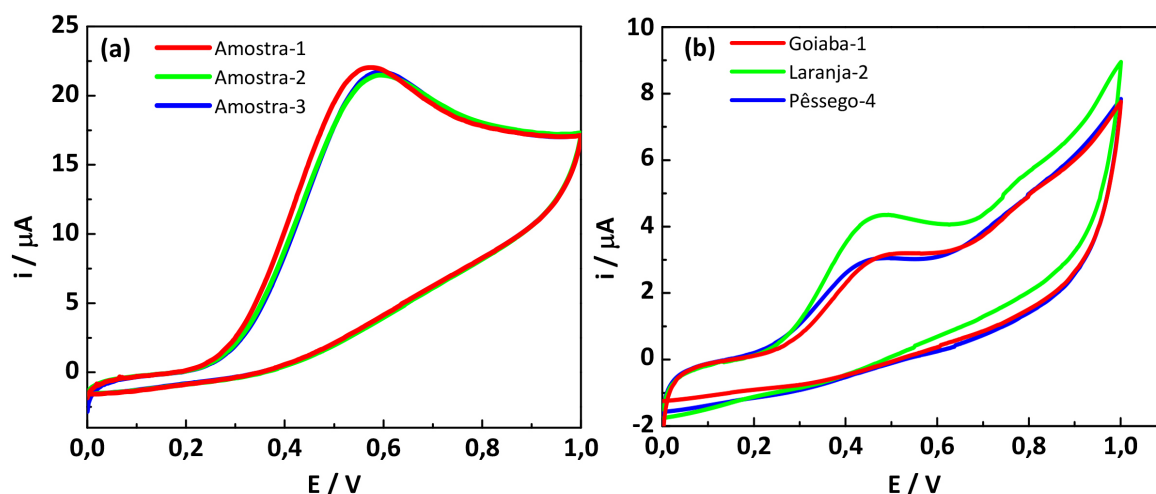


Figura 5. Voltamogramas cíclicos representativos dos sucos analisados. Código do suco: (a) Uva-6 (versão kids). As curvas referem-se a análises diferentes de uma mesma marca de suco. (b) Laranja-2; Goiaba-1; Pêssego-4

A concentração de ácido ascórbico, em  $\text{mmol L}^{-1}$  e em  $\text{mg L}^{-1}$ , foi calculada a partir do valor da corrente de pico anódico. O valor de corrente foi substituído na equação da curva analítica,  $y = -0,22348 + 3,80285x$ , e obteve-se o valor de concentração de ácido ascórbico, em  $\text{mmol L}^{-1}$ , o qual foi multiplicado pela massa molar do ácido ascórbico,  $176,12 \text{ g mol}^{-1}$ , obtendo-se a concentração de ácido ascórbico, em  $\text{mg L}^{-1}$ .

Um modo de avaliar a exatidão do método é por meio do cálculo do erro relativo ( $E_r$ ), expresso em percentagem conforme a Equação (1):<sup>29</sup>

$$E_r = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100 \quad (1)$$

sendo:  $X_{lab}$  = valor obtido ou média aritmética de valores obtidos experimentalmente. Nesse caso utilizou-se as duas formas de cálculo e os valores estão reunidos na Tabela 1S (ver Material Suplementar).  $X_v$  = valor admitido como verdadeiro (considerou-se os valores presentes nos rótulos das embalagens de suco).

Considerando que o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) estabelece um desvio padrão relativo ( $s_r$ ) máximo aceitável através da equação de Horwitz,<sup>29</sup> onde  $C$  é a razão entre a massa do analito e a massa da amostra. Para concentrações de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ , substituindo na equação de Horwitz, Equação (2), tem-se um  $s_r$  máximo de 7,2%:

$$s_r = 2^{(1 - 0,5 \log C)} \quad (2)$$

Fez-se a suposição que a fração mássica,  $C$  (razão analito/matriz) seja 200 ppm ( $\text{mg/kg}$ ), que é um valor típico, considerando 200 mg de vitamina C em 1 L de amostra analisada (suco) e que  $d = 1 \text{ g cm}^{-3}$ .

A partir dos resultados da Tabela 1S (ver Material Suplementar), observa-se que, em geral, o método eletroquímico apresentou precisão, pois os valores de desvio padrão relativo ( $s_r$ ) foram menores de 7,2%, exceto para os sucos Goiaba-1 e Uva-4b, cujos valores de  $s_r$  foram 13,3% e 8,3%, respectivamente.

Segundo Fabris; João e Borges,<sup>30</sup> o INMETRO e a



ANVISA estabelecem que o erro relativo, que expressa a exatidão do método, não pode exceder 15%. Foi possível verificar que, dos 11 sucos analisados, o método atendeu a esse quesito para 3 sucos, Laranja-1 ( $E_r = -1,0\%$ ); Uva-4a ( $E_r = -13,5\%$ ) e Uva-5 ( $E_r = -13,8\%$ ). Portanto, para esses sucos, o método eletroquímico mostrou-se exato e preciso. Vale destacar que os 3 sucos *kids* apresentaram concentrações de ácido ascórbico que não estão em conformidade com o que foi declarado nos rótulos dos produtos, Uva-4c ( $E_r = -20,1\%$ ); Uva-4d ( $E_r = -28,8\%$ ) e Uva-6 ( $E_r = +263,2\%$ ). Chama atenção a alta concentração de ácido ascórbico encontrada no suco *kids* denominado Uva-6. Até mesmo uma análise qualitativa permite perceber que as correntes de oxidação do ácido ascórbico dessa amostra são muito mais elevadas do que aquelas das outras (ver Tabela 1S, Material Suplementar).

A partir desses resultados, onde observou-se altos valores de erro relativo para determinação de ácido ascórbico na maioria das amostras, sugere-se a ocorrência de efeitos de matriz ou que o ácido ascórbico encontra-se presente nos sucos em concentrações maiores ou menores, em relação ao informado pelo fabricante. Para explorar melhor um possível efeito de matriz, foram realizadas as curvas de calibração utilizando-se o método da adição de padrão.

### 3.2. Método da adição de padrão

As Figuras 6 e 7 apresentam os voltamogramas cíclicos e uma curva de adição de padrão representativa, respectivamente, para um suco analisado. A Tabela 2S (ver Material Suplementar), reúne os resultados obtidos para os sucos analisados, pelo método da adição de padrão.

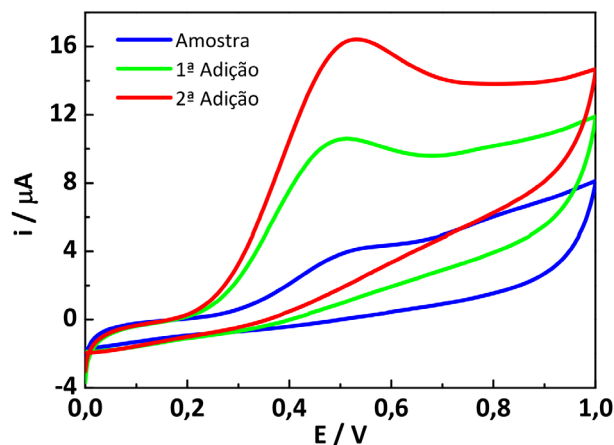
As curvas de calibração de adição de padrão (a exemplo da Figura 7) foram elaboradas colocando-se corrente,  $i_{\text{ácido ascórbico}} / \mu\text{A}$  (corrigida) em função de  $C_{\text{ácido ascórbico adicionado}} / \text{mmol L}^{-1}$ . Os valores de  $i_{\text{ácido ascórbico}} / \mu\text{A}$  (corrigida), foram calculados utilizando a Equação (3):

$$\text{Corrente corrigida} = \text{corrente medida} \left( \frac{\text{volume final}}{\text{volume inicial da amostra}} \right) \quad (3)$$

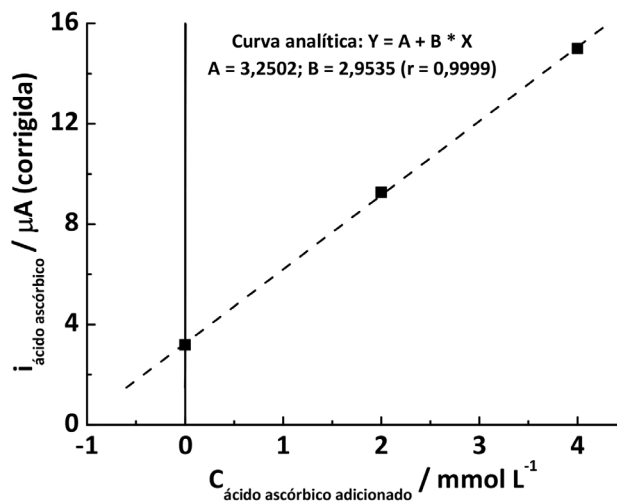
A corrente de oxidação do ácido ascórbico foi corrigida para compensar a diluição pela adição de padrão. O produto  $\text{corrente medida} \left( \frac{\text{volume final}}{\text{volume inicial da amostra}} \right)$  é a “resposta corrigida”, porque corresponde à corrente que seria medida se a amostra não fosse diluída.<sup>31</sup> Ou seja, se o volume da amostra fosse mantido em 5,00 mL, a corrente seria maior. Os valores de  $C_{\text{ácido ascórbico adicionado}} / \text{mmol L}^{-1}$  foram calculados utilizando-se a Equação (4):

$$C_{\text{ácido ascórbico adicionado}} = C_{\text{ácido ascórbico antes da adição à amostra}} \left( \frac{\text{volume adicionado do padrão}}{\text{volume inicial da amostra}} \right) \quad (4)$$

Segundo Holler, Skoog e Crouch<sup>32</sup> o método de adição de padrão é útil na análise de amostras complexas, nas



**Figura 6.** Voltamogramas cíclicos representativos dos sucos analisados. Cada cor (azul, verde e vermelha) refere-se a uma amostra diferente do mesmo suco. São mostrados os voltamogramas das amostras, e da 1ª e da 2ª adição de padrão. Código do suco: Uva-4d (versão *kids*)



**Figura 7.** Curva de calibração de adição de padrão (corrente corrigida em função da concentração de ácido ascórbico adicionado). São mostradas as correntes medidas para a amostra, e para a 1ª e 2ª adição de padrão. Código do suco: Uva-4d (versão *kids*)

quais os efeitos de matriz são significativos. As adições são incrementos de uma solução padrão na própria amostra. Assim, as medidas são feitas na amostra original antes da adição de padrão e também após cada adição. A matriz contendo o analito permanece idêntica, sendo apenas a concentração do padrão alterada. A partir dos sinais obtidos nas medidas, é feita a construção de um gráfico do sinal analítico (corrente, por exemplo) *versus* a concentração do padrão; extrapolando-se a reta até um valor de “x” onde “y = 0”, é possível obter a concentração do analito na amostra. No caso da adição de padrão, onde adiciona-se volumes sucessivos de padrão num dado volume de amostra, obtém-se a concentração do analito na amostra original. As adições de padrão devem aumentar o sinal analítico entre 1,5 e 3 vezes.<sup>31</sup> A dedução da equação da adição de padrão (adições sucessivas), mostrada abaixo, normalmente não encontra-se disponível nos livros texto de Química Analítica. A Equação (5) é a equação da adição de padrão:

$$\frac{[X]_i}{[X]_f + [S]_f} = \frac{I_x}{I_{s+x}} \quad (5)$$

$$[X]_f = [X]_i \left( \frac{V_o}{V} \right) \quad (6)$$

$$[S]_f = [S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right) \quad (7)$$

Somando-se as Equações (8) e (9):

$$[X]_f + [S]_f = [X]_i \left( \frac{V_o}{V} \right) + [S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right) \quad (8)$$

Substituindo-se a Equação (10) na Equação (7):

$$\frac{I_x}{[X]_i} = \frac{I_{s+x}}{[X]_i \left( \frac{V_o}{V} \right) + [S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right)}$$

$$I_x [X]_i \left( \frac{V_o}{V} \right) + I_x [S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right) = I_{s+x} [X]_i \quad [X]_i$$

$$I_x \left( \frac{V_o}{V} \right) + I_x \frac{[S]_i}{[X]_i} \left( \frac{V_s}{V} \right) = I_{s+x} \quad x \frac{V}{V_o}$$

$$I_{s+x} \left( \frac{V}{V_o} \right) = I_x + \frac{I_x}{[X]_i} [S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right) \quad (9)$$

onde:  $[X]_i$  é a concentração final do analito na amostra original;  $[X]_f$  é a concentração final do analito após adicionar o padrão;  $[S]_f$  é a concentração final do padrão após a adição à amostra;  $I_x$  é o sinal analítico da amostra;  $I_{s+x}$  é o sinal analítico da mistura (amostra + padrão);  $V_o$  é o volume de amostra desconhecida;  $V_s$  é o volume adicionado de padrão com concentração  $[S]_i$ ;  $V$  é o volume total da amostra + padrão, dado por  $V_o + V_s$ .

A partir da Equação (9) observa-se que a curva de calibração é dada por  $I_{s+x} \left( \frac{V}{V_o} \right)$ , a ser lançada no eixo y do gráfico, *versus*  $[S]_i \left( \frac{V_s}{V} \right)$ , a ser lançada no eixo x do gráfico.

A magnitude da interseção com o eixo x é a concentração original da amostra desconhecida,  $[X]_i$ . A equação da reta é  $y = b + ax$ . A interseção com o eixo x é obtida fazendo-se  $y = 0$ :  $0 = b + ax$ ,  $x = -\frac{b}{a}$ .

A concentração de ácido ascórbico na amostra original foi obtida utilizando-se a curva de calibração da adição de padrão. Tomando-se como exemplo a curva analítica da Figura 7:

$$y = 3,25023 + 2953,55x$$

Fazendo  $y = 0$ , tem-se que  $x = -1,100$

$$C_{\text{ácido ascórbico na amostra original}} = 1,100 \text{ mmol L}^{-1}$$

Convertendo para  $\text{mg L}^{-1}$ :

$$C_{\text{ácido ascórbico}} = 1,100 \text{ mmol L}^{-1} \times 176,13 \text{ gmol}^{-1} = 193,83 \text{ mg L}^{-1}$$

A partir dos resultados da Tabela 2S (ver Material Suplementar), observa-se que, em geral, o método eletroquímico apresentou precisão, pois os valores de  $s_r$  foram menores de 7,2% para a maioria dos sucos analisados, exceto para os sucos Maçã-3, Goiaba-1, Uva-4b e Uva-4c (versão *kids*), cujos valores de  $s_r$  foram 14,0%, 21,8%, 10,5%, e 10,0%, respectivamente. Também, verificou-se que o método apresentou linearidade, com valores de  $r$  maiores que o critério de aceitação da ANVISA, 0,990.<sup>28</sup>

A avaliação da exatidão do método da adição de padrão foi realizada a partir das recuperações médias para dois níveis diferentes de ácido ascórbico (2,000 e 4,000  $\text{mmol L}^{-1}$ ) nas amostras de suco analisadas. Os valores de recuperação foram obtidos a partir da Equação (10):<sup>28</sup>

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (10)$$

Os valores de concentração média experimental de ácido ascórbico ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), da quinta e sétima colunas Tabela 3S (ver Material Suplementar), foram calculados utilizando-se a equação da curva de calibração da adição de padrão,  $y = 3,28682 + 2,93335x$ .

Os valores  $C_{\text{ácido ascórbico adicionado}} / \text{mmol L}^{-1}$ , que também podem ser chamados de “Concentração teórica”, foram calculados usando-se a Equação (4), resultando em 2,000 e 4,000  $\text{mmol L}^{-1}$ , para adições sucessivas de 100  $\mu\text{L}$  e 200  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

A partir dos cálculos de recuperação do padrão adicionado, que nesse caso foi uma solução de ácido ascórbico 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , obteve-se valores compreendidos entre 92,59 e 101,4%, conforme Tabela 3S (ver Material Suplementar), o que indica a exatidão do método analítico. Na faixa de concentração do analito investigado (~200 ppm), o INMETRO considera que, para 100 ppm de analito, índices de recuperação média do analito compreendidos na faixa de 90% a 107% indicam que o método é exato.<sup>29</sup>

Conforme apresentado na Tabela 2S (ver Material Suplementar), considerando o método da adição de padrão, o número de amostras que apresentou conformidade com a quantidade de ácido ascórbico declarada no rótulo do suco aumentou significativamente em comparação com o método dos padrões externos, de 3 para 7 amostras analisadas: Laranja-1, Maçã-3, Uva-4a, Uva-4b, Uva-4c (versão *kids*), Uva-4d (versão *kids*) e Uva-5, dado que o  $E_r$  nesses casos não excedeu 15%.<sup>30</sup>

Importante mencionar que os autores realizaram uma análise padrão do teor de ácido ascórbico em sucos de caixinha em uma amostra que apresentou a concentração de ácido ascórbico similar ao declarado na embalagem (Laranja-1) e em uma amostra que apresentou a concentração acima da declarada na embalagem (Laranja-2), utilizando o

“Método 364/IV - Determinação de vitamina C com iodato de potássio”<sup>15</sup> e os resultados foram concordantes com aqueles obtidos pelo método eletroquímico.

Os índices de recuperação do analito adicionado apontaram que a matriz não exerceu efeito sobre o mesmo, e portanto a matriz também não exerceria efeito sobre o analito contido na amostra. No entanto, a presença de analito adicionado, em uma forma mais facilmente detectável do que o analito originalmente presente na amostra, pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas de recuperação.<sup>29</sup> Ou seja, tais índices de recuperação não descartam completamente um possível efeito de matriz. De fato, o valor de coeficiente angular da curva de calibração obtida pelo método dos padrões externos foi significativamente maior do que aqueles das curvas de calibração referentes ao método da adição de padrão (comparar Figuras 4(b) e 7), o que pode ser indicativo de interferência dos constituintes da matriz.<sup>28</sup> Dessa forma, a partir dos resultados obtidos por voltametria cíclica para os sucos analisados, pelos métodos dos padrões externos e da adição de padrão, considera-se que o método da adição de padrão é mais recomendado do que o método dos padrões externos. Ao determinar cálcio no leite em pó, por meio da técnica de Fluorescência de Raios X, Chan e Palmer<sup>33</sup> observaram que, quando existe efeitos de matriz, o método da adição de padrão fornece resultados mais exatos do que o método dos padrões externos.

Nesse trabalho os autores utilizaram como eletrodo de trabalho um disco de platina, especialmente porque esse é mais viável para utilização nas aulas práticas no ensino superior. No entanto, em pesquisas na área de eletroanalítica, o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados (EQM) vem desde a década de 70, e tendo como finalidade principal melhorar a seletividade para detecção de diversos tipos de analito. O termo EQM relaciona-se com a inserção de espécies quimicamente ativas à superfície dos eletrodos, com o objetivo de intensificar as propriedades eletroanalíticas, melhorando as interações com o analito, aumentando a reatividade e a seletividade entre solução/eletrodo.<sup>34</sup>

Os EQM's permitiram estudos mais complexos para diferentes analitos e amostras reais. Há uma diversidade de materiais modificantes (orgânicos, inorgânicos, organometálicos e nanomateriais). Grande parte dos analitos são compostos orgânicos e biológicos, com aplicações na área da saúde e meio ambiente. As aplicações visam uma melhora na qualidade de vida da população, resultante da detecção e monitoramento de diversas substâncias (defensivos agrícolas, princípios ativos de medicamentos e estudo de perfis biológicos).<sup>34</sup>

King, Friend e Kariuki,<sup>6</sup> utilizando a técnica de voltametria cíclica (método da adição de padrão) encontraram a concentração de  $107,9 \pm 7,0$  mg/250 mL de ácido ascórbico em suco de laranja usando um eletrodo alternativo de grafite de lápis; usando um eletrodo de carbono comercial a quantidade de vitamina C determinada foi de  $97,7 \pm 5,9$  mg/250 mL. A quantidade de vitamina C no suco determinada por titulação iodométrica foi de

$103,3 \pm 0,2$  mg/250 mL, não havendo diferença significativa entre os todos os valores encontrados. Dessa forma, os autores<sup>6</sup> concluíram que o suco analisado continha mais vitamina C do que a quantidade indicada no rótulo (60 mg/250 mL).

O método desenvolvido por Pisoschi, Danet e Kalinowski,<sup>24</sup> baseado na voltametria cíclica, apresentou exatidão para determinação de vitamina C em suco de frutas; a recuperação de quantidades conhecidas de ácido ascórbico variou entre 94,35% e 104%. Pisoschi e colaboradores<sup>25</sup> também desenvolveram um método para determinar a concentração de ácido ascórbico em sucos de frutas e vinho por voltametria de pulso diferencial, VPD, sendo o índice de recuperação compreendido entre 94,74 e 104,97%. Os resultados da avaliação do ácido ascórbico por VPD foram concordantes com aqueles obtidos por VC.

Ainda, Pisoschi e colaboradores<sup>25</sup> estudaram a interferência do ácido cítrico, do ácido tartárico, do ânion benzoato e da glicose no comportamento eletroquímico do ácido ascórbico, utilizando a VPD, e eletrodo de trabalho de platina ou de pasta de carbono, e mostraram que, nas concentrações comumente encontradas em sucos, refrigerantes e vinhos, esses compostos orgânicos não causam interferências significativas na determinação do ácido ascórbico. Pisoschi, Danet e Kalinowski<sup>24</sup> chegaram na mesma conclusão, avaliando a interferência desses mesmos compostos na determinação de ácido ascórbico por VC e utilizando eletrodo de disco de platina, em suco de fruta longa vida ou natural.

#### 4. Conclusões

O presente trabalho mostrou a viabilidade da utilização de uma técnica eletroanalítica, a voltametria cíclica, para a determinação de vitamina C em um produto alimentício. O método utilizado é simples, rápido, não exige tratamento da amostra e não produz resíduos tóxicos. Além disso, o sistema eletroquímico foi miniaturizado.

Verificou-se que a vitamina C está presente em todas as marcas de suco analisadas, sendo que em alguns casos em uma concentração bem diferente do valor informado no rótulo da embalagem, pelo fabricante. Chama atenção a alta concentração de ácido ascórbico encontrada no suco *kids* denominado Uva-6, em relação ao que foi declarado nos rótulos dos produtos. Até mesmo uma análise qualitativa permite perceber que as correntes de oxidação do ácido ascórbico dessa amostra são muito mais elevadas do que aquelas das outras, o que mostra a importância do desenvolvimento de métodos (eletro)químicos de análise desses produtos alimentícios.

Considerando os resultados das 11 amostras analisadas, o método da adição de padrão apresentou-se mais apropriado, em comparação com o método dos padrões externos. Isso pode estar relacionado ao fato do primeiro compensar possíveis efeitos de matriz. O presente trabalho



apresenta-se como uma ótima ferramenta didática para explorar, na prática, conceitos envolvidos na disciplina de química analítica instrumental, que são muito abstratos para os alunos.

## Informações Suplementares

Informações Suplementares (tabelas contendo os dados obtidos experimentalmente e tratados, utilizando o métodos do padrão externo e o método da adição de padrão) estão disponíveis gratuitamente em <https://rvq.s bq.org.br/>.

## Agradecimentos

Jéssica A. Oliveira agradece a bolsa de iniciação científica da FAPEMIG, concedida por meio do Edital nº 30/2017/PROPPG/UFTM, de 16/10/2017. Vinícius N. Silveira agradece a bolsa de iniciação científica da UFTM, concedida por meio do Edital nº 13/2020/PROPPG/UFTM, de 17/04/2020. Os autores agradecem à Rede Mineira de Química (RQ-MG)/FAPEMIG (Processos REDE-113/10; CEX-RED-00010-14), pelo fomento, e ao Comitê Especial de Acompanhamento da COVID-19 da UFTM, que autorizou o uso do laboratório durante a pandemia, para execução de alguns experimentos para inclusão nesse artigo.

## Referências Bibliográficas

1. Ferreira, D. C. M.; Giordano, G. F.; Soares, C. C. S. P.; Oliveira, J. F. A.; Mendes, R. K.; Piazzetta, M. H.; Gobbi, A. L.; Cardoso, M. B.; Optical paper-based sensor for ascorbic acid quantification using silver nanoparticles. *Talanta* **2015**, *141*, 188. [[Crossref](#)]
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). Human vitamin and mineral requirements. Thailand: Food and Nutrition Division, 2001. [[Link](#)][[Crossref](#)]
3. Spínola, V.; Martínez, E. J. L.; Castilho, P. C.; Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1369*, 2. [[Crossref](#)]
4. Du, J.; Cullen, J. J.; Buettner, G. R.; Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* **2012**, *1826*, 443. [[Crossref](#)]
5. Gazdik, Z.; Zitka, O.; Petrova, J.; Adam, V.; Zehnalek, J.; Horna, A.; Reznicek, V.; Beklova, M.; Kizek, R.; Determination of vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Sensors* **2008**, *8*, 7097. [[Crossref](#)]
6. King, D.; Friend, J.; Kariuki, J.; Measuring vitamin C content of commercial orange juice using a pencil lead electrode. *Journal of Chemical Education* **2010**, *87*, 507. [[Crossref](#)]
7. Nishikimi, M.; Yagi, K.; Biochemistry and Molecular Biology of Ascorbic Acid Biosynthesis. *Subcellular Biochemistry* **1996**, *25*, 17. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
8. Coutinho, M. S.; Morais, C. L. M.; Neves, A. C. O.; Menezes, F. G.; Lima, K. M. G.; Colorimetric determination of ascorbic acid based on its interfering effect in the enzymatic analysis of glucose: an approach using smartphone image analysis. *Journal of Brazilian Chemical Society* **2017**, *28*, 2500. [[Crossref](#)]
9. Merck S/A. CEBION® (ácido ascórbico). Comprimidos efervescentes 1g (sabor laranja). [[Link](#)]
10. Moretti, M.; Budni, J.; Freitas, A. E.; Rosa, P. B.; Rodrigues, A. L. S.; Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. *Journal of Psychiatric Research* **2014**, *48*, 16. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
11. Zhou, S. S.; Zhou, Y.; Excess vitamin intake: an unrecognized risk factor for obesity. *World Journal of Diabetes* **2014**, *5*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
12. Padayatty, S. J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J. H.; Chen, S.; Corpe, C.; Dutta, A.; Dutta, S. K.; Levine, M.; Vitamin C as an antioxidant: evolution of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition* **2003**, *22*, 18. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Anvisa: Brasília, 2005. [[Link](#)]
14. Zhao, W. Z.; Cao, P. P.; Zhua, Y. Y.; Liua, S.; Gaob, H. W.; Huangc, C. Q.; Rapid detection of vitamin C content in fruits and vegetables using a digital camera and color reaction. *Química Nova* **2020**, *43*, 1421. [[Crossref](#)]
15. Zenebon, O.; Pascuet, N. S.; Tiglia, P.; *Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos*, 4a ed., Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, 2008.
16. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. [[Link](#)]
17. Rego, R. A.; Vialta, A.; Mad, L. F. C.; *Sucos industrializados: e outras bebidas não carbonatadas*, 1ª ed., Bb Editora: Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas: São Paulo, 2020. [[Link](#)]
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. [[Link](#)]
19. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37, de 1º de outubro de 2018. Estabelece os parâmetros analíticos de suco e de polpa de frutas e a listagem das frutas e demais quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade. [[Link](#)]
20. Hoehne, L.; Marmitt, L. G.; Métodos para a determinação de vitamina C em diferentes amostras. *Destques Acadêmicos* **2019**, *11*, 36. [[Link](#)]
21. O'Connell, P. J.; Gormally, C.; Pravda, M.; Guillbault, G. G.; Development of an amperometric l-ascorbic acid (Vitamin C)

- sensor based on electropolymerised aniline for pharmaceutical and food analysis. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *431*, 239. [[Link](#)]
22. Hernández, Y.; Lobo, M. G.; González, M.; Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods Analytical. *Food Chemistry* **2006**, *96*, 654. [[Crossref](#)]
  23. Pacheco, W. F.; Semaan, F. S.; Almeida, V. G. K.; Ritta, A. G. S. L.; Aucélio, R. Q.; Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. *Revista Virtual de Química* **2013**, *5*, 516. [[Crossref](#)]
  24. Pisoschi, A. M.; Danet, A. F.; Kalinowski, S.; Ascorbic acid determination in commercial fruit juice samples by cyclic voltammetry. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry* **2008**, *16*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
  25. Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Negulescu, G. P.; Pisoschi A.; Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules* **2011**, *16*, 1349. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
  26. Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L.; A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* **2018**, *95*, 197. [[Crossref](#)]
  27. Paiola, I. F.; Faria, A. C. A.; Araújo, D. A. G.; Takeuchi, R. M.; Santos, A. L.; Miniaturização de uma célula eletroquímica em um experimento didático de voltametria cíclica: economizando reagentes e minimizando a geração de resíduos. *Revista Virtual de Química* **2017**, *9*, 953. [[Crossref](#)]
  28. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Anvisa, 2017. [[Link](#)]
  29. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Coordenação Geral de Acreditação. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008, Revisão 09, 2020. [[Link](#)]
  30. Fabris, B. T.; João, J. J.; Borges, E. M.; Quantificação de nitrito em água utilizando um scanner de mesa. *Revista Virtual de Química* **2020**, *12*, 569. [[Crossref](#)]
  31. Harris, D. C.; *Análise química quantitativa*, 8ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2012.
  32. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; *Princípios de análise instrumental*, 6a ed., Bookman: Porto Alegre, 2009.
  33. Chan, J. C.; Palmer, P. T.; Determination of calcium in powdered milk via X-ray fluorescence using external standard and standard addition based methods. *Journal of Chemical Education* **2013**, *90*, 1218. [[Crossref](#)]
  34. Monteiro, M. D. S.; Santos Júnior, J. C.; Sussuchi, E. M.; Eletroquímica: Eletrodos Modificados e suas Potencialidades. *Revista Virtual Química* **2020**, *12*, 1145. [[Crossref](#)]