

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MECANISMO REACIONAL DE ETANOTIOL EM  
ELETRODO DE OURO E SEU COMPORTAMENTO  
EM SISTEMAS REDOX**

**TESE DE DOUTORADO**

**Daiane Dias**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

**MECANISMO REACIONAL DE ETANOTIOL EM ELETRODO  
DE OURO E SEU COMPORTAMENTO EM SISTEMAS  
REDOX**

**por**

**Daiane Dias**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**MECANISMO REACIONAL DE ETANOTIOL EM ELETRODO DE  
OURO E SEU COMPORTAMENTO EM SISTEMAS REDOX**

elaborada por  
**Daiane Dias**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Paulo Cícero do Nascimento, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)**

---

**Carine Viana da Silva, Dr.<sup>a</sup> (UNIPAMPA)**

---

**Jacqueline Arguello, Dr.<sup>a</sup> (UFRGS)**

---

**Ulrich Hasse, Dr. (Universidade de Greifswald)**

Santa Maria, 10 de agosto de 2012

Dedico

Dedico este trabalho aos meus pais, Telmo de Azevedo Dias e Beatriz Zanatta Dias pelo amor e por todos os ensinamentos durante minha vida, sempre me guiando para o melhor caminho.

À minha irmã, Viviane Dias pelo apoio e amor.

Ao Marcelo Oliveira Fonseca pelo amor e dedicação.

Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento, meus sinceros agradecimentos pela orientação, amizade e confiança no decorrer destes anos de parceria.

Ao Prof. Dr. Fritz Scholz pela disponibilidade e orientação durante o período do doutoramento sanduiche na Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Alemanha.

Ao Dr. Ulrich Hasse pela orientação em conjunto ao Prof. Scholz, pela amizade, carinho e participação na defesa, colaborando grandiosamente com o trabalho.

Aos Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa, Prof. Dr. Almir Spinelli, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carine Viana da Silva, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Arguello pela disponibilidade e colaborações na qualificação e/ou defesa.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Bohrer do Nascimento pela amizade no decorrer destes anos.

A minha família que sempre me apoiou em cada etapa de minha vida, me guiando e incentivando em tudo, meu eterno agradecimento e amor. Ao meu noivo, Marcelo, pela paciência e amor.

Aos meus amigos Michele A. Presta e Hans Krabbe pela ajuda no projeto, amizade e confiança. Em especial a minha amiga Michele, que vem me acompanhando desde o início da graduação, como orientadora, supervisora, colega, amiga e exemplo de pessoa.

Ao meu amigo e professor Pyta, pela ajuda, carinho e disponibilidade.

Ao grupo do Prof. Dr. Fritz Scholz por ter me acolhido durante 11 meses.

A todos os colegas e amigos do LACHEM, pela convivência, carinho, ajuda, apoio e pelos momentos de descontração vividos durante todo esse período.

Agradeço especialmente as minhas amigas Ananda Fagundes Guarda e Bruna Wiethan pela super ajuda na realização da segunda parte deste trabalho, finalização do mesmo. Ao Luís Evandro Claussen e ao Aleksandro Colim pela ajuda e amizade. A Thaís Dal Molin, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline de Oliveira Fogaça e a Vinícola Velho Amâncio pela organização e doação de amostras.

As minhas antigas e enternas amigas Ana Paula Boscato, Emilene M. Becker, Luciana D. Del Fabro e Daniele Correia por todo o carinho e ajuda em todos estes anos.

A todos os funcionários e professores que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de doutorado.

Ao DAAD e CAPES pelas bolsas concedidas.

## **RESUMO**

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **MECANISMO REACIONAL DE ETANOTIOL EM ELETRODO DE OURO E SEU COMPORTAMENTO EM SISTEMAS REDOX**

AUTORA: DAIANE DIAS  
ORIENTADOR: PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO  
Santa Maria, 10 de agosto de 2012.

Compostos de enxofre podem interferir na qualidade do produto final do vinho, uma vez que apresentam odor indesejável característico. O etanotiol é considerado um composto interessante do ponto de vista eletroquímico, uma vez que pode se oxidar ou se reduzir podendo então ser estudado tanto em superfícies de eletrodos polarizados quanto em uma solução redox. Sendo assim, o presente trabalho foi dividido no estudo do mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo polarizado (eletrodo de ouro) e o estudo do comportamento do etanotiol frente a sistema redox em solução (vinho). A primeira parte foi desenvolvida aplicando-se técnicas como voltametria cíclica, de pulso diferencial e microscopia de força atômica. Isto possibilitou obter uma completa caracterização eletroquímica do etanotiol no eletrodo de ouro em meio alcalino, no que se refere ao mecanismo reacional do mesmo, e também uma ampla caracterização morfológica do eletrodo de ouro. Na segunda parte do trabalho realizou-se o estudo da influência do etanotiol na atividade antioxidante de compostos presentes no vinho (resveratrol e ácido gálico), assim como sua influência na atividade antioxidante e na concentração de fenóis totais no vinho. Os vinhos estudados foram: Cabernet Sauvignon safras 2012 e 2006, Merlot safras 2012 e 2008, Pinot noir tinto e rose safra 2012, Chardonnay safra 2011. Além disso, realizou-se a determinação eletroanalítica de etanotiol (representando a classe de tióis de baixo peso molecular), sulfeto inorgânico e sulfito, utilizando-se a voltametria de redissolução catódica e eletrodo de mercúrio de gota pendente em meio ácido.

Palavras-chave: voltametria, microscopia de força atômica, eletrodo de ouro, vinho, atividade antioxidante, concentração de fenóis totais.

## **ABSTRACT**

Doctorate Thesis in Chemistry  
Post- Graduate in Chemistry  
Federal University of Santa Maria

### **REACTIONAL MECHANISM OF ETHANETHIOL ON GOLD ELECTRODE AND ITS BEHAVIOUR IN REDOX SYSTEMS**

AUTHOR: DAIANE DIAS

ADVISOR: PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO  
Santa Maria, August 10<sup>th</sup>, 2012.

Sulphur compounds can interfere with product quality of the wine, since they have a characteristic undesirable odor. The ethanethiol is considered an interesting compound from the electrochemical point of view, since it can become oxidized or reduced and thus, it can be studied both on polarized electrode surfaces and redox solutions. Therefore, the present work was divided in the study of reaction mechanism of ethanethiol on polarized electrode (gold electrode) and the study of the ethanethiol behavior in the redox system in solution (wine). The first part was developed by applying techniques such as cyclic voltammetry, differential pulse and atomic force microscopy. This allowed a complete characterization of ethanethiol on electrochemical gold electrode in alkaline medium with respect to its reaction mechanism, and also a large morphological characterization of the gold electrode. In the second part of the work a study about the ethanethiol influence on the antioxidant activity of compounds present in wine (resveratrol and gallic acid) and its influence in the antioxidant activity and in the concentration of phenolic compounds in wine was carried out. The wines were: Cabernet Sauvignon Cabernet (2012 and 2006), Merlot (2012 and 2008), Pinot noir red and rose (2012) and Chardonnay (2011). Moreover, the electroanalytical determination of the ethanethiol (representing the class of low molecular weight thiols), inorganic sulfide and sulfite, using the stripping voltammetry and cathodic electrode mercury drop in acid medium, was carried out.

Keywords: voltammetry, atomic force microscopy, gold electrode, wine, antioxidant activity, total phenol concentration.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina e com etanotiol ( $1200 \text{ mV s}^{-1}$ ) .....	39
FIGURA 2 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina e com etanotiol em diferentes velocidades de varredura.....	40
FIGURA 3 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro e etanotiol (6,44 mM) em solução alcalina em diferentes velocidades de varredura .....	41
FIGURA 4 – Voltamograma cíclico de eletrodo de ouro com etanotiol ( $E_{\text{pt}} = -0,5 \text{ V}$ ).....	42
FIGURA 5 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro policristalino em solução alcalina com etanotiol .....	44
FIGURA 6 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro monocristalino Au {111} em solução alcalina com etanotiol.....	44
FIGURA 7 – Dependência dos valores de corrente e concentração.....	46
FIGURA 8 – Voltamograma cíclico de eletrodo de ouro (tratamento eletroquímico e medida em células diferentes) a $600 \text{ mV s}^{-1}$ .....	46
FIGURA 9 – Voltamograma cíclico de eletrodo de ouro (tratamento eletroquímico e medida em células diferentes) com diferentes velocidades de varredura.....	47
FIGURA 10 – Voltamograma cíclico de eletrodo de ouro (tratamento eletroquímico e medida em células diferentes) com $E_{\text{pt}} = -0,5 \text{ V}$ .....	47
FIGURA 11 – Dependência dos valores de corrente dos picos com a velocidade de varredura e com a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	48
FIGURA 12 – Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ouro em solução alcalina ( $E_{\text{pt}} = 0,19 \text{ V}$ ).....	49

FIGURA 13 – Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ouro em solução alcalina ( $E_{pt} = 0,55$ V).....	50
FIGURA 14 – Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ouro em solução alcalina ( $E_{pt} = 0,3$ V).....	51
FIGURA 15 – Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ouro em solução alcalina ( $E_{pt} = 0,19$ V, tratamento eletroquímico e medida em células diferentes)....	52
FIGURA 16 – Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ouro em solução alcalina ( $E_{pt} = 0,55$ V, tratamento eletroquímico e medida em células diferentes)..	52
FIGURA 17 – Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ouro em solução alcalina ( $E_{pt} = 0,3$ V, tratamento eletroquímico e medida em células diferentes)...	53
FIGURA 18 – Relação entre tempo de adsorção do eletrodo em solução de etanotiol e porcentagem da diminuição do sinal do rutênio .....	54
FIGURA 19 – Relação entre concentração de etanotiol adsorvido submetida a adsorção do eletrodo e porcentagem da diminuição do sinal do rutênio. ....	55
FIGURA 20 – Imagens de AFM <i>ex situ</i> de eletrodo de ouro policristalino após polimento e ciclos com etanotiol .....	56
FIGURA 21 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina com etanotiol em diferentes ciclos.....	57
FIGURA 22 – Dependência dos números de ciclos versus a concentração de ouro determinada .....	58
FIGURA 23 – Imagens de AFM <i>in situ</i> de eletrodo de ouro policristalino após polimento e após ciclos em solução alcalina .....	59

FIGURA 24 – Imagens de AFM <i>in situ</i> de eletrodo de ouro policristalino após tratamentos.....	60
FIGURA 25 – Dependência da rugosidade do eletrodo de ouro com o número de saltos....	61
FIGURA 26 – Imagens de AFM <i>ex situ</i> de eletrodo de ouro policristalino após polimento e após ciclos em solução alcalina (600 mV s <sup>-1</sup> ).....	62
FIGURA 27 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina com diferentes números de ciclos (600 mV s <sup>-1</sup> ) .....	63
FIGURA 28 – Dependência dos números de ciclos versus e valores de corrente do pico e área da redução do ouro. ....	64
FIGURA 29 – Imagens de AFM <i>ex situ</i> de eletrodo de ouro policristalino após polimento e após ciclos em solução alcalina (100 mV s <sup>-1</sup> ).....	64
FIGURA 30 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro policristalino em solução alcalina com etanotiol em diferentes tipos de tratamento.....	66
FIGURA 31 – Valores da atividade antioxidante do resveratrol, etanotiol e resveratrol + etanotiol .....	70
FIGURA 32 – Valores da atividade antioxidante do ácido gálico, etanotiol e ácido gálico + etanotiol .....	71
FIGURA 33 – Gráficos de decaimento de valores de concentração de fenóis totais em amostras de vinho com diferentes tempos de exposição .....	75
FIGURA 34 – Voltamogramas das amostras de vinhos.....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores de atividade antioxidante e concentração de fenóis totais nas nas amostras de vinhos controle .....	73
TABELA 2 – Valores de concentração de etanotiol, sulfeto inorgânico e sulfito em amostras de vinhos .....	77
TABELA 3 – Recuperações dos analitos em amostras de vinho .....	80

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

<b>AA</b>	Atividade Antioxidante
<b>AFM</b>	Microscopia de Fora Atômica
<b>Au</b>	Ouro
<b>C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub></b>	Concentraes de 1 a 4 (ou de acordo com o número)
<b>DP</b>	Pulso Diferencial
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>E<sub>final</sub></b>	Potencial final
<b>E<sub>inicial</sub></b>	Potencial inicial
<b>E<sub>pt</sub></b>	Potencial de pré-tratamento
<b>Etsh</b>	Etanotiol
<b>FPD</b>	Detec Ftomtrica de Chama
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfeto inorgânico
<b>HMDE</b>	Eletrodo de mercúrio de gota pendente
<b>HS-SPME</b>	Micro-Extra em Fase Sólida Acoplado a <i>Headspace</i>
<b>IC</b>	Cromatografia Iônica
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de Emiss ptica com Plasma Indutivamente Acoplado
<b>MS</b>	Espectrometria de Massas
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxignio
<b>PFPD</b>	Detec Ftomtrica por Chama Pulsada
<b>S</b>	Enxofre
<b>SH</b>	Til
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dióxido de enxofre
<b>STM</b>	Microscopia de Varredura por Tunelamento
<b>SXD</b>	Difrac de Raio-X de Cristal nico
<b>t<sub>pt</sub></b>	Tempo de pré-tratamento no eletrodo
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>XPS</b>	Espectroscopia de Raio-X
<b>v</b>	Velocidade de varredura

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Compostos sulfurados .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Generalidades .....	19
3.1.2 Processos de adsorção e dessorção de tióis em eletrodos ouro .....	20
3.1.3 Metodologias analíticas .....	24
<b>3.2 Sistemas redox em solução – estudos em vinhos.....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Vinhos e compostos sulfurados .....	26
3.2.2 Atividade antioxidante e concentração de fenóis totais .....	30
3.2.3 Determinação de compostos sulfurados em vinho .....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Instrumentação .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Reagentes, soluções e amostras.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Eletrodos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Procedimentos voltamétricos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Procedimentos espectrofotométricos .....</b>	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Parte I – Mecanismo reacional de etanotiol em eletrodo de ouro.....</b>	<b>39</b>
5.1.1 Estudo eletroquímico de etanotiol com eletrodo de ouro em solução alcalina .....	39
5.1.1.1 Voltametria Cíclica .....	39
5.1.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial.....	49
5.1.2 Ataque de radicais OH em eletrodo de ouro recoberto com etanotiol .....	53
5.1.3 Mudanças morfológicas de superfície de ouro e suas influências em processos eletrocatalíticos .....	58
5.1.3.1 Influência <i>in situ</i> da voltametria cíclica e de aplicação de potenciais anódicos e catódicos na morfologia de eletrodo de ouro policristalino em solução alcalina. ....	58

5.1.3.2 Comportamento electrocatalítico.....	62
5.1.3.2.1 Influência ex situ da voltametria cíclica na morfologia de eletrodo de ouro policristalino em solução alcalina e na redução de oxigênio...62	
5.1.3.2.2 Influência da ativação e desativação de ouro policristalino no perfil voltamétrico do etanotiol.....	65
5.1.3.2.3 Influência da voltametria cíclica em solução etanotiólica alcalina sobre o eletrodo de ouro policristalino e na redução de oxigênio. ...	66
5.1.4 Conclusões – Parte I.....	67
<b>5.2 Parte II – Comportamento do etanotiol frente a sistemas redox em solução .....</b>	<b>68</b>
5.2.1 Influência do etanotiol na atividade antioxidante do resveratrol e do ácido gálico.....	69
5.2.2 Influência do tempo de exposição do etanotiol na atividade antioxidante e na concentração de fenóis em vinhos .....	72
5.2.3 Determinação voltamétrica de etanotiol em vinhos .....	76
5.2.4 Conclusões – Parte II.....	81
<b>6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Uma reação redox ocorre devido à transferência de elétrons em solução ou na superfície de um eletrodo e para que ela ocorra, faz-se necessário que o composto tenha a capacidade de se oxidar ou se reduzir. O etanotiol é um composto sulfurado que apresenta essa capacidade e, sendo assim, pode ser considerado um composto interessante do ponto de vista eletroquímico, uma vez que pode ser estudado tanto em superfícies de eletrodos polarizados quanto em uma solução, onde possa realizar transferência de elétrons.

O vinho é considerado um rico e complexo sistema químico contendo uma variedade de compostos e, dentre eles, os chamados antioxidantes, que podem existir naturalmente ou podem ser adicionados. Estes compostos dão qualidade ao vinho, mas também participam de uma série de reações, que em muitos casos podem levar a formação de espécies indesejáveis à qualidade final do produto. Uma importante fonte de enxofre encontrada no vinho é o sulfito. Ele é adicionado para a inibição do desenvolvimento de bactérias e leveduras indesejáveis ao processo, para auxiliar na extração de pigmentos (MACHADO et al., 2006), além de deter a fermentação alcoólica no momento desejado. A maior parte do sulfito permanece na forma combinada com o acetaldeído existente, mas há uma porção livre que pode, através da fermentação alcoólica, gerar compostos indesejáveis, como o sulfeto inorgânico e as mercaptanas de baixo peso molecular como, por exemplo, o etanotiol.

Deste modo, o presente trabalho está dividido em duas partes: i) o estudo do mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo polarizado (eletrodo de ouro) e ii) o estudo do comportamento do etanotiol frente a sistemas redox em solução (vinho).

O foco da primeira parte do trabalho foi estudar o mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo de ouro, utilizando voltametria e microscopia de força atômica. Para tal, fez-se necessário também o estudo morfológico do eletrodo de ouro e suas influências em processos catalíticos, assim como estudo de ativação e desativação da superfície e a relação com radicais OH.

A segunda parte dedica-se ao estudo do comportamento do etanotiol frente a um complexo sistema redox em solução, o vinho. Nestes sistemas redox encontrados em vinhos, há a presença de várias classes de compostos químicos, com destacada importância para a relação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante. Sendo assim, avaliou-se se o etanotiol interfere na atividade antioxidante e na concentração de fenóis totais presentes no vinho, uma



vez que este composto pode alterar as propriedades organolépticas do produto e conseqüentemente na sua qualidade final. Para tal, as amostras foram fortificadas com etanotiol e as atividades antioxidantes e concentração de fenóis totais foram monitoradas durante 60 dias. A determinação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin e Ciocalteu e a capacidade antioxidante foi determinada pelo método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH, do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (STASKO et al., 2008). As quantificações de etanotiol, sulfeto inorgânico e sulfito nas amostras de vinho foram realizadas por voltametria de redissolução catódica utilizando eletrodo de mercúrio de gota pendente em meio ácido.

Este trabalho apresenta como inovações, uma detalhada pesquisa sobre o comportamento eletroquímico do etanotiol, e a relação existente entre alguns dos sistemas redox presentes no vinho que podem incluir o etanotiol. De maneira geral, a determinação de compostos de enxofre e fenóis têm sido reportadas na literatura científica. Contudo, a relação entre estes compostos, apesar de ser de grande relevância, ainda é pouco explorada. O presente trabalho pretende contribuir neste sentido.

## 2 OBJETIVOS

- Propor um mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo de ouro em meio alcalino;
- Relacionar a morfologia da superfície do eletrodo de ouro quando o mesmo é submetido a diferentes variáveis (número de ciclos, velocidade de varredura, aplicação de potencial redutivo e oxidativo);
- Estudar a influência da morfologia do eletrodo em processos catalíticos;
- Estudar as influências de diferentes tratamentos de ativação e desativação do eletrodo de ouro no mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo polarizado;
- Estudar o comportamento do etanotiol depositado no eletrodo de ouro frente a ataque radicalar;
- Observar o comportamento do etanotiol no vinho;
- Avaliar a influência do etanotiol na atividade antioxidante e na concentração de fenóis totais em vinhos;
- Realizar a determinação quantitativa de etanotiol (representando as mercaptanas de baixo peso molecular), sulfeto inorgânico e sulfito em vinhos tinto, rose e branco.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Compostos sulfurados

#### 3.1.1 Generalidades

Compostos sulfurados têm sido extensivamente estudados, pois apresentam relações às vezes benéficas e outras vezes indesejáveis com as propriedades das matérias nos quais estão presentes. O sulfito, por exemplo, é um aditivo alimentar amplamente utilizado na indústria alimentícia e atua na inibição da deterioração provocada por bactérias, fungos e leveduras em alimentos ácidos, e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem (MACHADO et al., 2006). Já o sulfeto de hidrogênio e as mercaptanas em geral presentes em alimentos, bebidas e material de origem fóssil, são compostos corrosivos, tóxicos e apresentam odor desagradável.

No caso do vinho, o sulfito está presente porque é adicionado no processo da fabricação. O sulfeto de hidrogênio e as mercaptanas podem estar presentes, pois fazem parte dos produtos de degradação do sulfito. A razão principal para determinação quantitativa destes compostos em vinhos deve-se, às alterações indesejáveis nas propriedades organolépticas e conseqüentemente na qualidade final do produto.

Apesar da ampla utilização de sulfitos na indústria de alimentos, inúmeros efeitos adversos à saúde humana têm sido relacionados à ingestão desses aditivos alimentares, entre eles: náusea, irritação gástrica local, urticária e bronco espasmos em indivíduos asmáticos sensíveis. No caso do vinho, a legislação brasileira estabelece 0,035 g/100 mL como valor máximo permitido para sulfito (MACHADO et al., 2006).

O sulfeto de hidrogênio, sulfeto inorgânico ou ácido sulfídrico ( $H_2S$ ) é um ácido inorgânico, inflamável, tóxico e gasoso em seu estado natural. Caracteriza-se pelo odor de ovo pútrido e pode ser gerado de diversas maneiras como, por exemplo, em processos naturais

em atividades vulcânicas, processos de putrefação (degradação bacteriana de matéria orgânica), degradação de alguns aminoácidos (MIURA et al., 1996). No caso do vinho, este produto é indesejável e pode se formar a partir da degradação do sulfito adicionado na fabricação do vinho. O limite de concentração para percepção olfativa do ácido sulfídrico é de  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  (MIURA et al., 1996).

Sulfetos orgânicos ou tióis ( $\text{R-SH}$ ), também conhecidos como mercaptanas, são compostos que se encontram na forma gasosa ou como líquidos incolores, pouco solúveis em água e, os de baixo peso molecular, são muito voláteis, caracterizados por um odor penetrante e desagradável, que os torna reconhecíveis mesmo em mínimas concentrações. A exposição aos sulfetos orgânicos pode causar irritação das membranas das mucosas, dor de cabeça, vertigem, náusea, vômito e possível depressão do sistema nervoso central. Pode também causar edema pulmonar, danos ao fígado e rins. Estes compostos aparecem em pequenas concentrações em amostras de vinho (UGLIANO et al., 2010).

Apesar dos danos que o sulfeto inorgânico e as mercaptanas podem causar aos seres humanos, não existe legislação vigente para limites permitidos destes compostos em vinhos. Estabelecer estes valores é de extrema importância, uma vez que estes produtos podem ser gerados com a possível degradação do sulfito adicionado no vinho.

### 3.1.2 Processos de adsorção e dessorção de tióis em eletrodos ouro

Dentre os eletrodos polarizados utilizados, o de ouro é um dos mais amplamente estudados, possibilitando a realização de determinações analíticas de compostos, assim como estudos de mecanismos redox. Parâmetros como alterações morfológicas dos eletrodos de ouro e suas influências em processos catalíticos e o comportamento da superfície frente a ataque radicalar, ainda não foram muito explorados, embora sejam de suma importância para o entendimento dos processos que ocorrem na superfície do ouro.

Técnicas como voltametria cíclica e de pulso diferencial além de possibilitarem a quantificação dos compostos, permitem a compreensão de quais reações redox e/ou de adsorção estão acontecendo. Já com as informações que a microscopia de força atômica nos oferece, é possível visualizar as alterações morfológicas das superfícies após diferentes condições de tratamentos.

A voltametria cíclica mostra-se uma excelente técnica para interpretação de mecanismos de reação, uma vez que pode fornecer informações sobre o potencial em que os processos de oxidação e redução ocorrem, assim como os efeitos de adsorção. Também é empregada para elucidar a cinética das reações dos eletrodos frente a determinados compostos (HARRIS, 2001) uma vez que se realiza a varredura de potenciais direta e inversa em vários ciclos sucessivos, observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa. A voltametria de pulso diferencial é uma técnica complementar que auxilia nessa interpretação. Além disso, ambas as técnicas podem ser utilizadas para determinação e quantificação de elementos traços.

A caracterização morfológica do eletrodo de ouro utilizado em diferentes tipos de tratamentos e soluções também é de suma importância, e objetiva complementar os estudos eletroquímicos realizados no mesmo. Para tal a Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) tem se mostrado uma ferramenta poderosa onde é possível obter imagens que possibilitam visualizar moléculas individuais e acompanhar os processos no nível de moléculas isoladas. A AFM pode ser usada para mapear a composição sobre uma imagem e para detectar mudanças de composição que ocorrem durante um processo (COHEN, 2002). Utilizando a AFM, é possível obter imagens de resolução “atômicas” de superfícies de metais, dielétricos e semicondutores, auxiliando na compreensão do mecanismo reacional envolvido (MARTÍN-ALFONSO et al., 2009).

Estas duas técnicas podem ser aplicadas para o estudo do comportamento de tióis em ouro, abrangendo assim interpretações eletroquímicas e morfológicas.

Os tióis, quando ligados a uma superfície estável e quimicamente inerte, têm a capacidade e grande facilidade de formar monocamadas compactas e auto-organizadas oferecendo a possibilidade de vincular materiais inorgânicos, orgânicos e biológicos a esta superfície (COHEN-ATIYA et al., 2006; CORTES et al., 2009).

Estudos de interação entre ouro e tiol já foram realizados por diferentes métodos analíticos, como os espectroscópicos (LAIHO et al., 2003; BÜTTNER et al., 2006; MINATI et al., 2010; PETROSKI et al., 2009; MARISCAL et al., 2010; WANG e YOON, 2008; ZAYAK et al., 2011) e eletroquímicos (WALCZAK et al., 1995; ZHONG et al., 1997; SCHNEIDER e BUTTRY, 1993). Além disso, estudos teóricos e cálculos têm sido desenvolvidos, aplicados e correlacionados com os dados experimentais (MARISCAL et al., 2010; TORRES et al., 2009; OLMOS-ASAR et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2003).

Os processos de adsorção e dessorção de tióis em ouro têm sido estudados devido às suas propriedades físicas e químicas, além de possuir um amplo espectro de aplicações, como por exemplo, em estudos com nano eletrônicos (OHGI et al., 1998).

Evans e Ulam (1990) descreveram a formação de monocamadas em eletrodo de ouro a partir de alquiltióis de cadeia carbônica variável (de 6 a 22 carbonos). Eles afirmaram que o processo de adsorção consiste na fisissorção do tiol que, depois de um curto período de tempo em contato com a superfície do ouro, forma uma forte ligação covalente (40-45 kcal/mol) com o substrato (via formação do tiolato), associada à perda de  $H_2$  ou  $H_2O$ . Segundo Vericat e colaboradores (2005), as forças de van der Waals estabelecidas entre as moléculas vizinhas estabilizam a estrutura.

Alquiltióis podem ser eletroquimicamente dessorvidos do ouro por redução ou oxidação. Isto depende dos sítios de ligação morfologia da superfície, desprotonação do grupo tiol e do comprimento de cadeia (WALCZAK et al., 1995; WIDRIG et al., 1991; ZHONG e PORTER, 1997; ZHONG et al., 1997; WALCZAK et al., 1991).

Widrig e colaboradores (1991) e Yang e colaboradores (1997) investigando o mecanismo de dessorção reductiva de tióis em meio alcalino, a partir de uma monocamada quimissorvida em eletrodo de ouro, observaram através de medições vibracionais que processo envolvendo um elétron leva à formação de tiolatos. No caso de dessorção oxidativa de tióis, um processo mais complexo está envolvido.

O tamanho da cadeia carbônica ligada ao composto de enxofre presente nas moléculas de tióis tem relação direta com a taxa de recobrimento do eletrodo de ouro, assim como na forma como estes tióis aderidos à superfície do ouro se comportam nas medidas voltamétricas.

Em estudos sobre a determinação do recobrimento de superfície com monocamadas formadas pela quimissorção de tiol, em solução alcalina utilizando voltametria cíclica, uma onda catódica surge a partir da redução que envolve um elétron e na subsequente varredura anódica há a reoxidação parcial do tiolato dessorvido (WALCZAK et al., 1991).

Sistemas de cadeia curta exibem, em geral, uma única onda voltamétrica para os processos de adsorção e dessorção. No entanto, múltiplas ondas voltamétricas foram encontradas tanto para a dessorção, quanto para a adsorção dos sistemas de cadeia longa (ZHONG et al., 1997). O potencial da onda de dessorção é dependente da morfologia da superfície, como por exemplo, da cristalinidade do substrato de ouro (WALCZAK et al., 1995; LEZNA et al., 1990).

No caso do completo recobrimento da superfície do eletrodo na forma de monocamadas, Yang e colaboradores (YANG et al., 1997) mostraram que o aumento da solubilidade do tiol é um fator importante, pois influencia na diminuição da redeposição oxidativa. Eles sugerem também, que a presença de dois picos de corrente redutiva são devido as diferentes permeabilidades iônicas do tiol.

Yang e colaboradores (1996) mostraram que, com monocamadas auto-organizadas, a dessorção redutiva e oxidativa de tiol na superfície do ouro sofre uma forte dependência do pH do eletrólito e da velocidade de varredura. Quando a dessorção redutiva do tiol foi realizada em eletrólitos de pH mais baixo, picos de oxidação foram observados após a dessorção redutiva, com a conseqüente deposição oxidativa dos tióis. No entanto, com velocidades de varredura maiores, um pequeno pico oxidativo pode ser também observado em altos valores de pH. Yang e colaboradores (1996) acreditam que a densidade de carga na superfície e a orientação cristalográfica sobre o substrato desempenham um papel importante na dessorção redutiva da molécula de tiol, a partir da superfície, e sugerem que a rugosidade pode também influenciar na deposição oxidativa. Em superfícies mais lisas houve uma elevada taxa de recobrimento do eletrodo de ouro.

As propriedades eletroquímicas de espécies de sulfeto ( $S^{2-}$ ) também têm sido estudadas em detalhe, e permitem uma comparação entre estas propriedades com o comportamento eletroquímico do tiol em ouro (WIERSE et al., 1978; LEZNA et al., 1990; BUCKLEY et al., 1987; VERICAT et al., 2004).

Espécies de sulfeto, adsorvidas em eletrodo de ouro em solução alcalina mostram que em potenciais negativos, o enxofre pode ser catodicamente dessorvido, e em potenciais mais positivos o enxofre é oxidado anodicamente (WIERSE et al., 1978). Quando o crescimento de multicamadas de enxofre foi investigado, espécies solúveis de polissulfetos foram detectadas opticamente, quer como intermediários sob cinética de difusão controlada ou quer como produtos de uma reação química entre íons sulfeto e a camada de enxofre depositada (LEZNA et al., 1990). A oxidação anódica de  $S^{2-}$  em solução alcalina (pH 13) e o processo inverso sobre o ouro foram investigados por Buckley e colaboradores (1987), e os íons polissulfetos foram formados como intermediários em ambos os processos, e por uma reação química de enxofre depositado com espécies  $S^{2-}$  em solução.

Vericat e colaboradores (2004) analisaram resultados de adsorção de sulfeto em superfícies de Au {111} a partir de medidas eletroquímicas, por Microscopia de Varredura por Tunelamento *in situ* (STM, do inglês *Scanning Tunneling Microscopy*), Espectroscopia de Raio-X (XPS, do inglês *X-ray Spectroscopy*) e Difração de Raio-X de Cristal Único (SXRD, do

inglês *Single Crystal X-Ray Diffraction*). Eles afirmaram que a correlação entre interfaces S/Au {111} e alcanotiolato/Au {111} em soluções de hidróxido de sódio (NaOH) apresentam um papel fundamental na ligação S-Au para determinar a estrutura e a cinética de adsorção/dessorção para esses sistemas. Medidas *in situ* por STM e SXD permitiram observar transformações dependentes do adsorbato em tempo real. Dados de XPS relacionam transformações do adsorbato com as mudanças na natureza química da ligação S-Au.

É possível observar com esta revisão da literatura, que a maioria dos trabalhos que estudaram a relação tiol e eletrodo de ouro, se detém ao estudo de monocamadas, focando, por exemplo, na formação, dessorção e estabilidade das mesmas. Além disso, há trabalhos que tratam da determinação eletroanalítica de tióis utilizando eletrodo de ouro, mas não apresentam o estudo do mecanismo das reações que estão envolvidas nesse processo.

A classe tiol é formada por vários compostos. Estes compostos podem apresentar cadeia alifática ou aromática, saturada ou insaturada, com ou sem heteroátomos na estrutura (ROLAND et al., 2011). Contudo, é o enxofre presente nas moléculas de tióis que se liga ao ouro presente na superfície do eletrodo. A ideia principal do presente trabalho foi conectar o estudo do mecanismo reacional de um composto SH e o seu comportamento frente a um sistema redox em solução, e para tal escolheu-se o etanotiol como representante desta vasta classe de compostos. O etanotiol além de estar presente em sistemas redox em solução, como o vinho, possui alta afinidade com eletrodo de ouro, possibilitando assim, o estudo do seu mecanismo reacional com este tipo de superfície. Apresenta também a vantagem de melhor solubilização do que tióis de cadeia maior e um odor atenuado em relação a tióis de com cadeia aromática, por exemplo.

### 3.1.3 Metodologias analíticas

Várias metodologias analíticas para a determinação de compostos de enxofre vêm sendo desenvolvidos. Isso é devido à grande demanda das indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos, assim como indústrias petrolíferas.

No ramo alimentício e de bebidas, estudos destes compostos são de suma importância devido à aceitação dos consumidores no que se refere aos odores característicos que alguns compostos, como o sulfeto e tióis que podem estar presente. Vazquez-Landaverde



e colaboradores (2006) realizam quantificação de traços de compostos voláteis de enxofre em leite por micro-extração em fase sólida e Cromatografia Gasosa com Detecção Fotométrica por Chama Pulsada (PFPD, do inglês *Pulsed-flame Photometric Detection*). Mestres e Guash (1997), por meio de análises cromatográficas determinaram compostos de enxofre voláteis em vinho, utilizando *Headspace Static* com detecção fotométrica de chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detection*). Mestres e colaboradores (1999) realizaram estudos de determinação simultânea de tióis, sulfetos e dissulfetos em aroma de vinho por Micro-Extração em Fase Sólida Acoplado a Headspace (HS-SPME, do inglês *Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography*).

A determinação destes compostos também é realizada em matrizes como sangue, ar e amostras de origem fóssil (MARDINI et al., 1981; STEVENS et al., 1971; YIN e XIA, 2004) através de técnicas eletroforéticas com detecção por condutividade (HISSNER et al., 1999) ou por meio de determinações potenciométricas (GHANNAM, 2004).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é muito utilizada em amostras complexas como plasma (WANG et al., 2003) e produtos farmacêuticos (MODI et al., 2005). Esta técnica permite também a determinação destes compostos com diferentes modos de detecção (VIGNAUD et al., 2004; SCHMITZ et al., 2006; ALHAMA et al., 2006; OHIRA e TODA, 2006). Também pode ser utilizada para a determinação de composto de enxofre em vinhos. É uma técnica de separação que permite a obtenção de baixos limites de detecção quando associada ao detector adequado. Pode ser muito útil para a detecção de elementos traços, como as mercaptanas e sulfeto inorgânico, mas pode ser dispendiosa, ainda mais quando associada à utilização de etapas prévias de extração e *clean up*.

O uso da Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) em análise por cromatografia a gás permite a identificação e quantificação de uma grande variedade de compostos de enxofre em matrizes complexas como o vinho. Utilizando-se estes equipamentos podem-se obter baixos limites de detecção, que se aproximam dos limites obtidos por métodos de detecção seletivos convencionais, como o FPD. A detecção por MS possui como uma das vantagens o fato de que os compostos podem ser identificados baseados em suas massas características e seus espectros de massas, mas é uma técnica de custo elevado.

Assim, com o intuito de realizar ensaios onde se possa estudar o comportamento eletroquímico destes compostos, além da determinação de suas concentrações em análises rápidas e de baixo custo, a voltametria mostra-se uma técnica eficiente.

Compostos de enxofre podem ser determinados por voltametria utilizando-se eletrodo de carbono vítreo (SCAMPICCHIO et al., 2007; ENSAFI et al., 2008) ou eletrodos de ouro (CARUSO et al., 2006; POSSARI et al., 2006), assim como eletrodo de prata (SKVORTSOVA e KIRYUSHOV, 2002; MOHTAT et al., 2000). Mas eletrodos sólidos apresentam a desvantagem da difícil reprodutibilidade.

O eletrodo de mercúrio mostra-se uma alternativa eficaz para a determinação destes compostos, uma vez que apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade. Possibilita também a determinação simultânea de sulfetos inorgânico e tióis de baixo peso molecular utilizando eletrodo de mercúrio em meio ácido, com tempo de análise relativamente curto (DIAS et al., 2010).

O mecanismo reacional de compostos de enxofre com eletrodo de mercúrio tem sido exaustivamente estudado (DIAS et al., 2010; KALAL et al., 2000; KRZARNIC et al., 2001; REDINHA et al., 1997; UMIKER et al., 2002; MONTERROSO-MARCO e LÓPEZ-RUIZ, 2003) e sendo assim, faz-se necessário este estudo frente a outros eletrodos polarizados, como por exemplo, o eletrodo de ouro.

## **3.2 Sistemas redox em solução – estudos em vinhos**

### **3.2.1 Vinhos e compostos sulfurados**

O vinho é apreciado em diversas partes do mundo, sendo uma bebida alcoólica produzida pela fermentação do sumo da uva. O consumo do vinho tem crescido nos últimos anos, em parte, devido às pesquisas científicas que apontam os benefícios desta bebida para a saúde humana. Estes estudos demonstram que o vinho auxilia, por exemplo, no tratamento de doenças cardiovasculares e na diminuição do colesterol.

Tem comprovada ação bactericida e antiviral, retardando o envelhecimento celular. É conhecido por suas propriedades bioquímicas benéficas como: antioxidante, anticarcinogênico

e antiinflamatório. Estas propriedades são atribuídas aos compostos fenólicos presentes no vinho, destacando-se os flavonóides e o resveratrol (FLAMINI, 2003).

Os flavonóides e o resveratrol são fenóis de baixa massa molar encontrados em diversas plantas. Agem como fitoalexinas protegendo as plantas contra o estresse causado por ataque de pragas, patógenos e radiação ultravioleta (UV). São encontrados em várias frutas e vegetais, assim como em alimentos processados (BRONNER e BEECHER, 1995) e são responsáveis pelas características sensoriais e de coloração (FANG et al., 2008). Indústrias, pesquisadores e consumidores têm demonstrado grande interesse nestes compostos pelo seu potencial na prevenção de doenças cardiovasculares e suas propriedades antioxidantes.

O vinho passa por duas fases distintas de envelhecimento. A primeira ocorre após a fermentação em barris de madeira (como o carvalho) ou tanques de aço inoxidável (etapa de maturação) e a segunda etapa começa quando o vinho é engarrafado e está em um ambiente redutor (fase de conservação). As antocianinas, componentes do grupo dos flavonóides, estão amplamente distribuídas na natureza. São responsáveis pela coloração inicial do vinho, principalmente do vinho tinto, e a presença destas substâncias pode variar com alteração do pH e da concentração de dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) do meio (BAKKER e PRESTON, 1986), sendo que no vinho o efeito do  $\text{SO}_2$  na cor é muito mais importante do que o pH do meio, uma vez que auxilia na obtenção da coloração desejada.

A constituição química das uvas permite que estas fermentem sem que lhes sejam adicionados açúcares, ácidos, enzimas ou outros nutrientes, entretanto, são adicionados ao vinho grandes quantidades de aditivos químicos que auxiliam na sua conversão. Um dos aditivos mais utilizados é o  $\text{SO}_2$  que pode ser adicionado ao vinho na forma de sulfito. A sua principal função é de antioxidante, mas também age como desinfectante, antisséptico, antibacteriano, branqueador e conservante de produtos alimentares (BRONNER e BEECHER, 1995), além de ter relação direta com a coloração do produto. Contudo, em quantidades muito grandes pode alterar as propriedades do vinho, causando alergias em pessoas com hipersensibilidade e até mesmo alterando as características organolépticas do produto (FANG et al., 2008).

No vinho, o  $\text{SO}_2$  auxilia na inibição do desenvolvimento das leveduras e bactérias, detendo assim a fermentação alcoólica no momento desejado, ao mesmo tempo que assegura a esterilização do vinho. Estudos relatam que o  $\text{SO}_2$  “seleciona” as leveduras necessárias à vinificação, pois estas são mais resistentes que outras presentes no processo, porém não desejadas (BARNABÉ, 2006). Este aditivo é o produto enológico mais utilizado numa indústria vinícola. Ao ser adicionado ao mosto logo após o esmagamento das uvas, ele

elimina bactérias e as leveduras mais frágeis e indesejáveis permitindo que apenas as melhores estirpes sobrevivam e tomem conta do processo fermentativo que se segue.

Assim que é adicionado ao mosto ou vinho, o  $\text{SO}_2$  combina-se com inúmeros componentes (acetaldeído, ácidos cetônicos, urônicos, açúcares, moléculas do grupo dicarbonil e antocioninas) que são os principais responsáveis pela intensa e rápida reação química. A maior parte do  $\text{SO}_2$  adicionado permanece na forma combinada com o acetaldeído (REVISTA DE VINHOS, 2012), mas há uma porção livre que pode através da fermentação alcoólica, gerar compostos indesejáveis.

O que o enxofre faz de essencial é ligar-se ao acetaldeído formado na cadeia de oxidação de determinados fenóis monoméricos, mascarando assim seu aroma e o gosto impróprio, conhecido como gosto da oxidação.

Os compostos sulfurados presentes no fermentado compreendem os que apresentam enxofre na forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), de dissulfeto (-S-S-) usualmente não voláteis (em maior proporção), sulfeto inorgânico e mercaptanas (em menor proporção) (UFRGS, 2012).

O sulfeto inorgânico e as mercaptanas são compostos indesejáveis produzidos pela ação de certas leveduras durante a fermentação alcoólica, diante de condições extremas de carência de nutrientes no produto. Estas passam a se alimentar de aminoácidos que contêm enxofre, produzindo  $\text{H}_2\text{S}$  e RSH. Este processo pode ser facilitado pela incidência prolongada de luz (ADEGA, 2010). O  $\text{H}_2\text{S}$  também é utilizado para a síntese de aminoácidos que contenham enxofre na molécula (cisteína e metionina), mas se for produzido em excesso, será lançado ao meio.

As concentrações dos compostos sulfurados podem variar de acordo com a estirpe de levedura utilizada, com a composição do mosto, fatores climáticos e práticas agrônomicas (GREEN et al., 2011). O  $\text{H}_2\text{S}$  é um produto secundário da fermentação alcoólica que possui aroma de ovos podres, cujo limiar de percepção num vinho neutro varia entre 50 e 80  $\text{g L}^{-1}$  (RANKINE, 1964). Além dos fatores citados acima, têm sido apontados outros que condicionam a produção de  $\text{H}_2\text{S}$  durante a fermentação do vinho, tais como a concentração de compostos nitrogenados, o teor em compostos sulfurados, o estado de maturação da uva, as práticas enológicas, a taxa e a temperatura de fermentação e a estirpe de levedura (ESCHENBRUCH, 1974; HALLINAN et al., 1999; MENDES-FERREIRA et al., 2002; SPIROPOULOS et al., 2000). Sem dúvida, um dos fatores que se destaca pela sua importância, é a capacidade intrínseca da levedura para produzir  $\text{H}_2\text{S}$  (SPIROPOULOS et al., 2000).

Pelo fato do H<sub>2</sub>S ser bastante volátil, normalmente agitando-se e/ou decantando-se o vinho na taça e/ou garrafa, consegue-se eliminar este problema. Já as mercaptanas, que podem ser produzidas pela ação de leveduras nos aminoácidos do vinho ou das moléculas de sulfeto inorgânico, não podem ser removidas facilmente. Por serem menos voláteis que o H<sub>2</sub>S, com a agitação ou decantação, consegue-se diminuir seus efeitos indesejáveis, porém sem eliminá-los (ADEGA, 2012). Estes compostos sulfúricos, quando presentes abaixo do nível de percepção humana, podem produzir o efeito de "apagar" os aromas do vinho, deixando-os sem expressão, além de poderem causar dores de cabeça em pessoas alérgicas a estas substâncias (ADEGA, 2010).

De acordo com estudos recentes realizados por pesquisadores australianos (REVISTA DE VINHOS, 2012), para proteger o vinho ou mosto contra a oxidação, a dose mínima de SO<sub>2</sub> livre situa-se entre os 10 e 15 mg L<sup>-1</sup> e este número depende, obviamente, do tipo de vinho e respectivo pH.

A Organização Mundial de Saúde fixou um máximo de consumo diário de SO<sub>2</sub> equivalente a 0,7 mg L<sup>-1</sup> por quilo de peso. União Europeia aceita teores de 160 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> para vinho tinto (260 mg L<sup>-1</sup> para os brancos) até 300 mg L<sup>-1</sup> para vinhos doces e 400 mg L<sup>-1</sup> para vinhos com botrytis. A Austrália permite 250 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> para vinhos secos e 350 mg L<sup>-1</sup> para vinhos com mais de 35 g L<sup>-1</sup> de açúcar residual. A legislação dos Estados Unidos da América é emelhante a da Austrália. Qualquer vinho com mais de 10 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> (este número pode ser alcançado naturalmente e sem adição de compostos de enxofre) deve conter no rótulo "Contém Sulfetos" (do inglês, *Contains Sulfites*) (REVISTA DE VINHOS, 2012).

Os estudos presentes na literatura abordam com grande ênfase a relação do enxofre com a coloração dos vinhos no que se refere a sua reação com as antocianinas pertencentes à classe dos flavonóides. Apesar da coloração ser um dos atributos necessários para a avaliação sensorial do produto, as características organolépticas e as propriedades antioxidantes dos vinhos são também de suma importância. Como discutido anteriormente, há muitos relatos dos benefícios ocasionados pelo consumo de vinho, devido à presença de antioxidantes fenólicos, tais como os flavonóides e o resveratrol, mas não se sabe qual a relação da capacidade antioxidante destes compostos frente ao enxofre adicionado ao produto.

As relações entre os compostos de enxofre e os fenóis presentes no vinho, podem ser avaliadas através de técnicas espectrofotométricas levando-se em consideração a influência do etanotiol na atividade antioxidante e na concentração de fenóis totais no vinho.

Além dos estudos dos mecanismos reacionais do etanotiol, é de suma importância à determinação analítica do teor de compostos sulfurados e dos fenóis presentes no vinho, assim como avaliar a atividade antioxidante total destes fenóis.

### 3.2.2 Atividade antioxidante e concentração de fenóis totais

Compostos antioxidantes nos alimentos desempenham um papel importante como fator de proteção à saúde. A evidência científica sugere que os antioxidantes reduzem o risco de doenças crônicas, incluindo câncer e doenças cardíacas.

Diferentes métodos têm sido utilizados para determinar a atividade antioxidante de alimentos (PRAKASH, 2001) e bebidas. A avaliação do potencial antioxidante de vinhos pode ser realizada pela quantificação de uma substância específica (ex. resveratrol), pela quantificação de uma família de substâncias (ex. fenóis totais) ou pela avaliação da capacidade antioxidante frente a uma espécie radicalar padrão (GALLICE et al., 2011).

Uma das espécies radicalares mais utilizadas é DPPH. Ele é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. A determinação da atividade antioxidante total em vinho, como em outras amostras, pode ser realizada pela hidrogenação do radical livre DPPH frente a antioxidantes, produzindo um decréscimo em sua absorvância a 515 nm ou próximo disso (KIM et al., 2003). Esta determinação se baseia na redução do radical estável DPPH através da ação dos antioxidantes presentes na amostra. A medida espectrofotométrica de absorvância do radical é realizada antes de adicionar a amostra e depois de determinado tempo de reação.

Os fenóis compreendem um grupo de diferentes substâncias, constituído de várias classes de compostos, com propriedade antioxidante, presentes em vários alimentos e bebidas, mas em especial na uva e em seus derivados. Eles são os principais responsáveis pela coloração, aroma e adstringência dos vinhos. É devido à presença destes compostos que o vinho se tornou uma das bebidas mais famosas e de maior consumo no mundo. As principais características destes antioxidantes naturais é a prevenção do envelhecimento da pele e a redução do risco de eventos coronários.

Segundo Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos, como por exemplo: impedir a formação de radicais livres

indesejáveis, intercepção dos radicais livres evitando a formação de lesões e perda da integridade celular e reparo das lesões causadas pelos radicais.

A concentração de fenóis em vinho pode variar significativamente com o tipo de cultivar, com as condições agronômicas e climáticas. Esta concentração pode ser determinada com a especiação dos compostos presentes nas amostras utilizando-se, por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (GARCIA et al., 2004; STASKO et al., 2008), mas quando se deseja obter valor de fenóis totais, o método comumente utilizado é o de Folin e Ciocalteu que utiliza a espectrofotometria como técnica analítica (SOUSA et al., 2007). Este método é conhecido por ser de fácil aplicação, baixo custo e relativamente rápido, quando comparado a análises cromatográficas.

### 3.3.3 Determinação de compostos sulfurados em vinho

A produção de compostos sulfurados voláteis desagradáveis no vinho, como o sulfeto inorgânico e as mercaptanas, é um problema crônico na indústria mundial de vinho (CORDENTE et al., 2009). A literatura traz relatos de várias técnicas analíticas para determinação de compostos sulfurados, como está citado no item 3.1.3. A técnica mais utilizada para a determinação de compostos sulfurados é a Cromatografia Gasosa com diferentes tipos de detectores e associada a prévias extrações e/ou microextrações dos compostos (MATTIVI et al., 2012; SAN-JUAN et al., 2012; MAJCENOVIC et al., 2002; SCHNEIDER et al., 2003; ESCUDEIRO et al., 2004; BRAJKOVICH et al., 2005; VIVARACHO et al., 2010; CAPONE et al., 2011; FANG e QIAN, 2005; FERREIRA et al., 2007; RODRÍGUEZ-BENCOMO et al., 2009).

Bouchilloux e colaboradores (1998) realizaram análises dos extratos de vinho por cromatografia gasosa acoplada com detecção por olfatométrica, fotometria de chama, e espectrometria de massas levando à identificação de três tióis aromáticos.

Rauhut e colaboradores (1998) utilizaram um cromatógrafo gasoso com detector de quimiluminescência de enxofre acoplado a um detector de ionização de chama para detectar uma série de compostos de enxofre em amostras de vinhos. Dentre estes compostos destacam-se o sulfeto inorgânico e orgânico (metanotiol e etanotiol), com valores de concentrações entre 1,6 a 8,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,5 a 5,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, dependendo o tipo de vinho analisado.

Mestres e colaboradores (1999) realizaram determinações de 7 diferentes compostos sulfurados em vinhos branco, rose e tinto. Associando microextração dos analitos à detecção por cromatografia gasosa com detecção fotométrica de chama, os autores puderam observar que apesar do sulfeto inorgânico, metanotiol e etanotiol estarem presentes nos três tipos de vinhos, o sulfeto inorgânico está presente em maiores concentrações nos vinhos rose (5,3 a 34,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Já o metanotiol e etanotiol apresentam maiores valores de concentração em vinhos brancos (1,5 a 16,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 3,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Fang e Qin (2005) utilizaram a cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama pulsante associado à microextração prévia das amostras, para determinar 11 diferentes tióis em diferentes variedades de uvas (Pinot noir, Cabernet Sauvignon, Pinot Grigio, e Chardonnay) oriundas de diferentes localidades. Os valores de concentração de sulfeto inorgânico e metanotiol ficaram na faixa de 0,08 a 9,26  $\mu\text{g L}^{-1}$  e variam com os tipos de vinho analisados e os locais de origem.

Cromatografia Gasosa com detecção de massa também foi utilizada por Fedrizzi e colaboradores (2007) para determinar tióis em vinhos. Contudo, para estas determinações fez-se necessária a utilização de técnicas de extração e micro-extração.

Lopéz e colaboradores (2007) fizeram uso da cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama pulsante e da microextração prévia de 34 vinhos espanhóis. As concentrações máximas determinadas em vinho branco foram: 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de sulfeto inorgânico, 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  de metanotiol e 7,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de etanotiol. Os mesmos compostos foram determinados em vinho tinto, mas com valores menores de concentração.

Siebert e colaboradores (2010) realizaram a determinação de vários compostos de enxofre em 18 diferentes tipos de vinho, utilizando cromatografia gasosa com detector de quimiluminescência de enxofre. Foram calculados valores de concentração entre 0,5 a 35  $\mu\text{g L}^{-1}$  de sulfeto inorgânico; 0,2 a 8  $\mu\text{g L}^{-1}$  de metanotiol e 0,5 a 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de etanotiol.

No trabalho realizado por Ugliano e colaboradores (2010), os valores encontrados de sulfeto inorgânico, metanotiol e etanotiol para amostras de vinhos foram de 0,5 a 2,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 0,7 a 0,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 1,1 a 2,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Neste trabalho a cromatografia gasosa acoplada à detecção com emissão atômica foi utilizada.

Como já mencionado, o vinho é uma matriz de alta complexidade, o que em muitas vezes implica na necessidade de tratamento prévio da matriz. Tanto a cromatografia líquida quanto a gasosa necessitam de etapas prévias de *clean up* das amostras e muitas vezes de pré-concentração dos analitos, uma vez que os mesmo apresentam-se, na sua maioria, em baixas



concentrações. Estas etapas adicionais tornam as medidas cromatográficas ainda mais dispendiosas e demoradas.

A voltametria também tem se mostrado uma interessante técnica para a determinação dos compostos sulfurados do vinho. Diferentemente das técnicas cromatográficas, a voltametria possibilita a determinação destes compostos sem a necessidade de pré-tratamento da amostra, requisito este indispensável numa determinação cromatográfica.

Scampicchio e colaboradores (2008) desenvolveram um sensível método eletroquímico para determinação de sulfito em amostras de vinho utilizando eletrodo de carbono vítreo. O método é baseado na titulação com reagente de Ellman usando detecção voltamétrica no ponto final.

Outros métodos eletroanalíticos também foram desenvolvidos para determinação de sulfito em vinhos (CARDWELL e CHRISTOPHERSEN, 2000; SITUMORANG et al., 1999; CASELLA et al., 2002). Nestes casos, a determinação de compostos importantes para a qualidade do produto final, tais como sulfetos inorgânicos e orgânicos, não são abordados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Instrumentação

Os instrumentos que foram utilizados nesse trabalho estão divididos em duas partes. Os referentes a primeira parte do trabalho são os que foram utilizados para a realização do estudo do mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo de ouro (item 5.1) e os da segunda parte foram os empregados para o estudo do comportamento do etanotiol frente a sistemas redox (item 5.2).

Instrumentos utilizados na primeira parte:

- Medidas voltamétricas:

Processor 757 VA (Metrohm, Heriseau – Suíça);

Eletrodo de referência : Ag/AgCl/KCl (saturado);

Contra eletrodo: platina;

Eletrodo de trabalho: disco de ouro policristalino (2 mm, Metrohm) e eletrodo monocristalino de ouro (Schroer GmbH, Lienen Germany)

- Medidas morfológicas:

Microscópio de força atômica: Dual Scope™ C-26 DME, Scanning Probe & Optical Microscope.

- Medidas espectrométricas:

PerkinElmer Optima 2100DV

- Medida cromatográfica:

Dionex ICS 1000

- Irradiação UV:

Equipamento modelo 705 UV (Metrohm)

Instrumentos utilizados na segunda parte:

- Medidas voltamétricas:

Processor 646 VA (Metrohm, Heriseau – Suíça);

Eletrodo de referência : Ag/AgCl/KCl 3 mol L<sup>-1</sup>;

Contra eletrodo: platina;

Eletrodo de trabalho: eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE)

- Medidas espectrofotométricas:

Espectrofotômetro com Arranjo de Diodo Hewlett – Packard (HP – 8453 A)

Faixa de comprimento de onda: 220 – 800 nm

Resolução espectral: 1 nm

Cubeta de vidro para a medida: 1 cm de largura e 3 cm de comprimento

## 4.2 Reagentes, soluções e amostras

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções dos compostos sulfurados foram da marca Sigma-Aldrich, Merck e Vetec. As soluções foram solubilizadas em NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> (Merck). Utilizou-se água destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>) para o preparo das soluções.

Antes das medidas voltamétricas e microscópicas, a superfície do eletrodo de trabalho de ouro foi polida com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,05 μM) sobre uma superfície molhada, em seguida lavada com água desmineralizada (Sartorius, Millipore). Após, manteve-se o eletrodo em banho ultrasônico durante 20 minutos para completa remoção do óxido de alumínio.

Os reagentes utilizados para a determinação da atividade antioxidante (DPPH – Sigma-Aldrich) e da concentração de fenóis totais (reagente de Folin – marca Próton) foram preparados diariamente, uma vez que são sensíveis e de fácil degradação. O ácido gálico (Sigma-Aldrich) utilizado na determinação de fenóis totais foi solubilizado em etanol (Vetec).

As amostras de vinho foram adquiridas na região de Santa Maria – Rio Grande do Sul. Foram estudadas as seguintes amostras: Cabernet Sauvignon safras 2012 e 2006, Merlot safras 2012 e 2008, Pinot noir tinto e rose safra 2012, Chardonnay safra 2011.

### 4.3 Eletrodos

Eletrodo de ouro policristalino: disco de ouro (2 mm de diâmetro, Metrohm).

Eletrodo de ouro monocristalino: base de vidro de borossilicato ( $0,7 \text{ mm} \pm 0,1$  de espessura), com uma camada de cromo ( $2,5 \pm 1,5 \text{ mm}$  de espessura) e uma camada final de ouro ( $250 \pm 50 \text{ nm}$  de espessura). A largura do eletrodo é de  $11 \times 11 \pm 0,2 \text{ mm}$ . (Schroer GmbH, Lienen Germany). O substrato de vidro borossilicato é adequado para o processo de flambagem (em inglês - *flame annealing*) que é usado para obter Au {111}.

Eletrodo gotejante de mercúrio: Metrohm

### 4.4 Procedimentos voltamétricos

Os experimentos realizados por voltametria cíclica e de pulso diferencial foram utilizadas para realizar o estudo do mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo de ouro. Todos os experimentos foram realizados em meio alcalino ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Diversos parâmetros foram variados no decorrer dos experimentos para que o mecanismo proposto fosse testado e estes estão detalhados juntamente com os resultados.

Como o mecanismo do sulfeto inorgânico e dos tiois de baixo peso molecular em eletrodo de mercúrio por voltametria já foi amplamente estudado, e o método já foi estabelecido por nosso grupo de pesquisa (DIAS et al., 2010), o mesmo foi utilizado para as determinações analíticas dos compostos de interesse nas amostras de vinho.

Sendo assim, o eletrodo de mercúrio foi empregado no modo HMDE para determinar etanotiol (que neste trabalho irá representar as mercaptanas de baixo peso molecular), sulfeto inorgânico e sulfito em meio ácido por redissolução catódica, modo pulso diferencial (DP). O procedimento consistiu em adicionar na célula voltamétrica 1 mL da amostra de vinho, 1 mL de hidrazina ( $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 8 mL de água Milli-Q (pH da mistura 2,3). O desaeramento da solução foi feito com borbulhamento de nitrogênio (99,999 % de pureza) durante 5 minutos. Os voltamogramas foram obtidos utilizando potencial de pré-tratamento de 120 mV e tempo de pré-tratamento de 30 segundos. Para a etapa de redissolução, o intervalo de potenciais

utilizado foi de 150 a – 600 mV, com velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>. Foram utilizadas faixas de concentração de 200 a 600 µg L<sup>-1</sup>, 16 a 48 µg L<sup>-1</sup> e 1,5 a 4,5 mg L<sup>-1</sup> para etanotiol, sulfeto inorgânico e sulfito respectivamente. O tamanho de gota utilizada foi de 0,6 mm<sup>2</sup> (tamanho 9) e a amplitude de pulso de – 50 mV. O método de calibração utilizado foi adição do padrão.

#### 4.5 Procedimentos espectrofotométricos

A determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH<sup>•</sup> foi realizada através da modificação e adequação do método de Brand–Williams e colaboradores (1995) para amostras de vinho. Dilui-se as amostras 10 vezes (1 mL em balão volumétrico de 10 mL) e após misturou-se 1,52 mL da amostra diluída e 1,48 mL da solução etanólica de DPPH<sup>•</sup> 1×10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. O branco das amostras foi preparado com 1,52 mL da amostra diluída e 1,48 mL de etanotiol. A amostra foi mantida ao abrigo da luz e após 60 min a absorvância foi lida a 517 nm utilizando-se etanol:água para zerar o equipamento. Os resultados para a atividade antioxidante (AA) obtida são expressos de acordo com a equação:

$$\% \text{ AA} = \frac{\text{Absorvância do DPPH} - (\text{Absorvância da amostra} - \text{Absorvância do branco}) \times 100}{\text{Absorvância DPPH}}$$

Com isso, obteve-se a atividade antioxidante das diferentes amostras analisadas.

A quantificação de compostos fenólicos totais deu-se através da adequação e aplicação do método espectrofotométrico descrito por Sousa e colaboradores (SOUSA et al., 2007). O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por L (litro) de amostra.

O preparo das amostras se deu mediante a adição de 100 µL da amostra de vinho (diluída 10 vezes) a 2,5 mL do reagente de Folin diluído (1 mL do reagente 1 N em 10mL de água). Após 5 minutos, adicionaram-se 2 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio 7,5%. Esta mistura permaneceu em reação protegida da luz durante 1 hora e após realizou-se a medida espectrofotométrica em comprimento de onda de 740 nm. O mesmo procedimento foi

aplicado para a curva do ácido gálico. Para os vinhos tintos, foi utilizada curva de calibração de ácido gálico de 2 a 7 mg L<sup>-1</sup> e para vinhos branco e rose, utilizou-se curva de calibração de ácido gálico de 0,5 a 0,03 mg L<sup>-1</sup>.

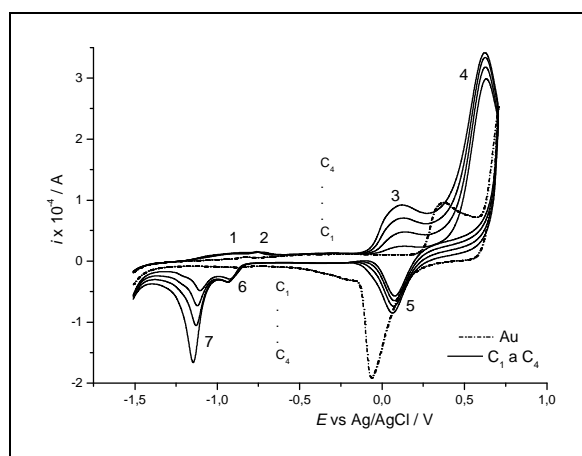
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Parte I – Mecanismo reacional de etanotiol em eletrodo de ouro

#### 5.1.1 Estudo eletroquímico de etanotiol com eletrodo de ouro em solução alcalina

##### 5.1.1.1 Voltametria Cíclica

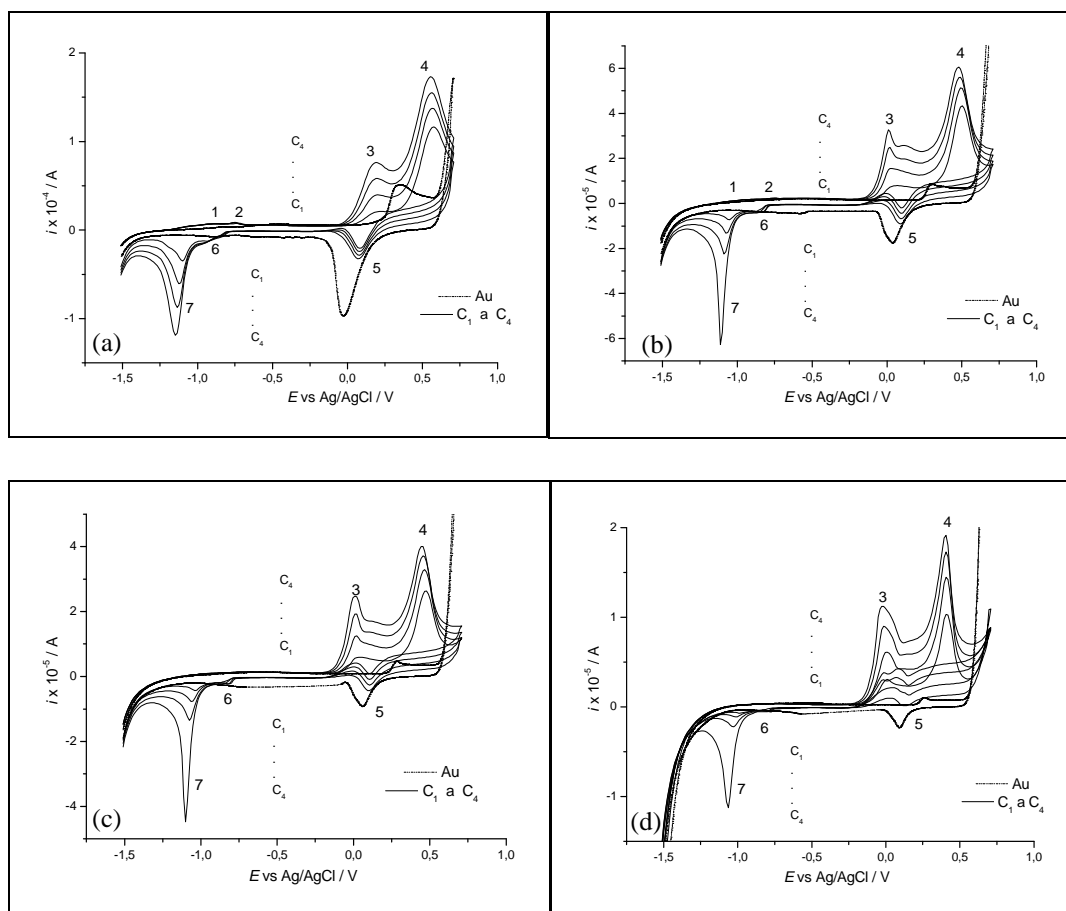
Voltametria cíclica é uma excelente técnica que pode fornecer informações sobre o potencial em que os processos de oxidação e redução ocorrem e os efeitos de adsorção. A figura 1 representa voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro policristalino (com e sem etanotiol) em solução.



**Figura 1** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina (NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>) (--) e (linha cheia) com etanotiol ( $C_1= 1,61$ mM,  $C_2= 3,22$  mM,  $C_3= 4,83$  mM e  $C_4= 6,44$  mM). Condições experimentais:  $t_{pt}$ : 30 s,  $E_{pt}$ : -1,5 V,  $E_{inicial}$ :-1,5 V,  $E_{inversão}$ : 0,7 V,  $v = 1200$  mV s<sup>-1</sup>.

Como pode ser observado, em solução alcalina, o eletrodo de ouro tem potenciais de oxidação e de redução de 0,346 e -0,027 V, respectivamente. Quando etanotiol é adicionado à solução, quatro picos de oxidação (-0,92, -0,77, 0,12 e 0,62 V) e três picos de redução (0,08, -0,93 e - 1,15 V) podem ser observados e neste trabalho serão chamados de pico 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente.

O mesmo experimento foi realizado a 600, 100, 50 e 10  $\text{mV s}^{-1}$  e está representado na figura 2:



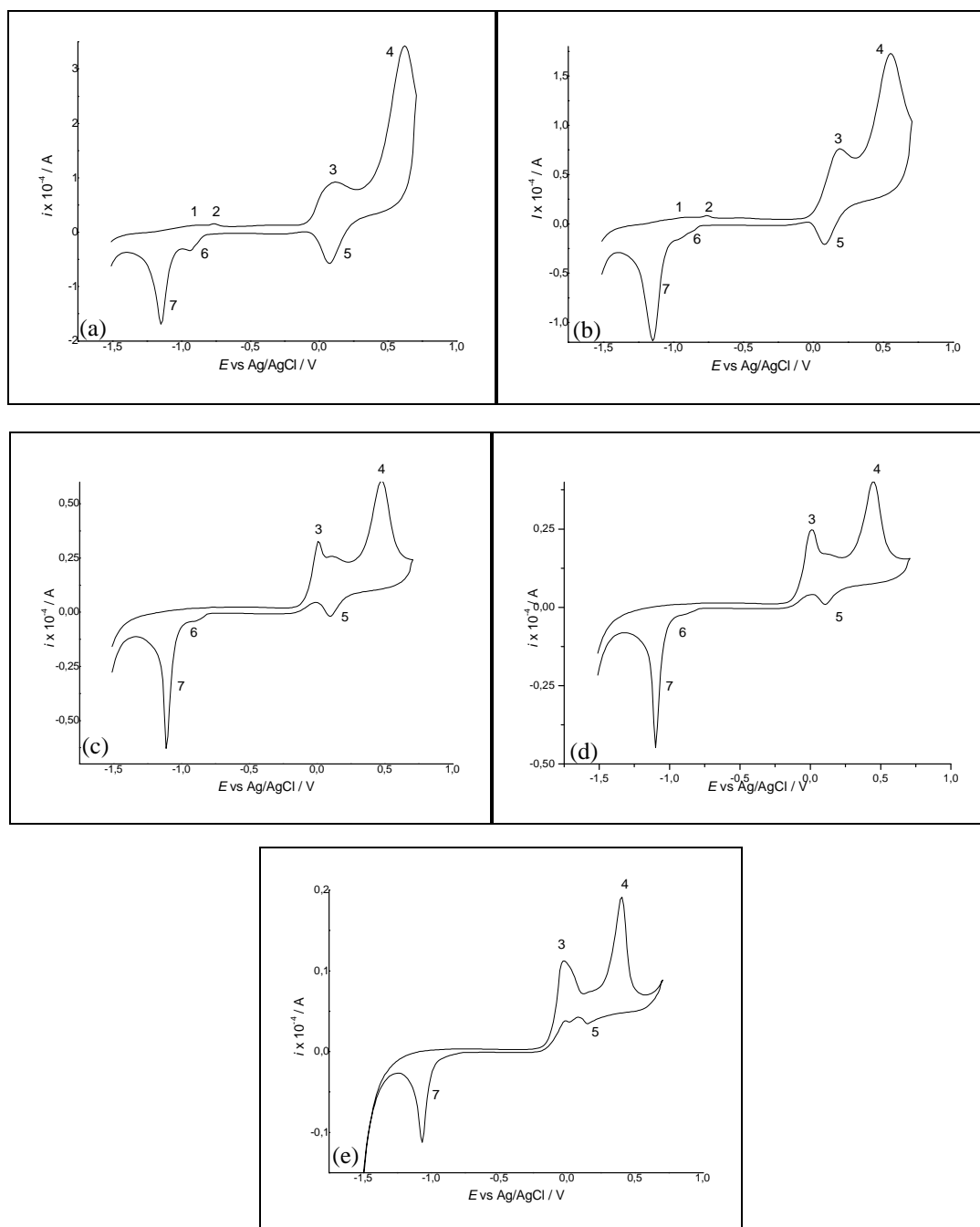
**Figura 2** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ) (--) e (linha cheia) com etanotiol ( $C_1 = 1.61 \text{ mM}$ ,  $C_2 = 3.22 \text{ mM}$ ,  $C_3 = 4.83 \text{ mM}$  e  $C_4 = 6.44 \text{ mM}$ ). Condições experimentais:  $t_{\text{pt}}: 30 \text{ s}$ ,  $E_{\text{pt}}: -1.5 \text{ V}$ ,  $E_{\text{inicial}}: -1.5 \text{ V}$ ,  $E_{\text{inversão}}: 0.7 \text{ V}$ ,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$  (a),  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (b),  $50 \text{ mV s}^{-1}$  (c) e  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (d).

Considerando a figura 2 (a...d) é possível observar uma mudança no perfil dos voltamogramas em função da velocidade de varredura de potenciais. No sentido de velocidades decrescentes (a  $\rightarrow$  d) observa-se uma diminuição nos valores da corrente de picos para os processos anódicos e catódicos. Além disso, ocorre também um pequeno



deslocamento do potencial do pico 3 para valores mais positivos e um deslocamento para valores mais negativos dos picos 6 e 7. Os picos 5 e 6 mantiveram-se nos mesmos potenciais.

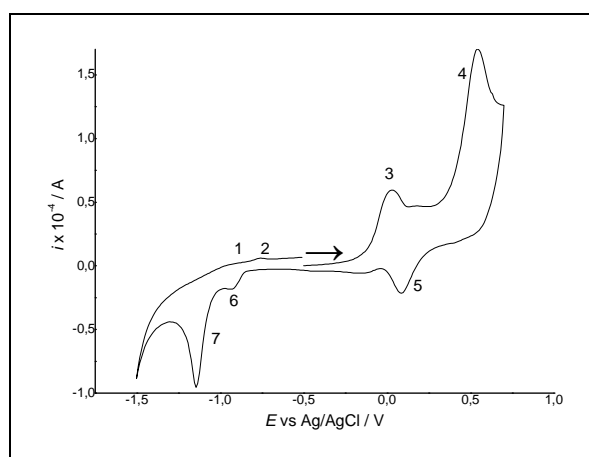
Observando a figura 3 é possível consolidar a afirmação anterior e também visualizar melhor as diferenças nos valores de corrente de picos para o eletrodo de ouro sob diferentes velocidades de varredura em solução 6,44 mM de etanotiol.



**Figura 3** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro e etanotiol 6,44 mM em solução alcalina (NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>) com diferentes velocidades de varredura. (a) 1200 mV s<sup>-1</sup>, (b) 600 mV s<sup>-1</sup>, (c) 100 mV s<sup>-1</sup>, (d) 50 mV s<sup>-1</sup> e (e) 10 mV s<sup>-1</sup>. Condições experimentais:  $t_{pt}$ : 30 s,  $E_{pt}$ : -1,5 V,  $E_{inicial}$ : -1,5 V,  $E_{inversão}$ : 0,7 V.

Os picos 1, 2 e 6 apresentam valores mais baixos de corrente de pico do que os outros picos (picos 3, 4, 5 e 7). Em velocidades de varredura mais baixas não se pode visualizar os picos 1, 2 e 6, uma vez que nesta condição ocorre um aumento no tempo de reação no eletrodo e, como consequência, a menor taxa de difusão do etanotiol em solução desfavorece as reações 1 e 5 (ver a seguir). Com a diminuição da velocidade de varredura é possível também observar um gradual deslocamento do pico 4 para valores mais positivos.

Para obter mais informações sobre perfil voltamétrico do eletrodo de ouro com etanotiol em solução alcalina, foram utilizadas condições experimentais similares às aquelas mostradas na figura 3, alterando-se porém o potencial de pré-tratamento de -1,5 para -0,5 V (Figura 4).



**Figura 4** - Voltamograma cíclico de eletrodo de ouro com etanotiol ( $t_{pt} = 30$  s;  $E_{pt} = -0,5$  V;  $C = 6,44$  mM) em solução alcalina ( $\text{NaOH} = 0,5$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) ( $E_{inicial} = -0,5$  V,  $E_{inversão} = 0,7$  V,  $v = 600$  mV  $\text{s}^{-1}$ )

Pode-se afirmar que mesmo modificando o potencial de pré-tratamento, o comportamento voltamétrico foi similar àquele mostrado na figura 3b apenas com um pequeno deslocamento do pico 4 que será tratado mais adiante.

A partir dos voltamogramas mostrados anteriormente o seguinte mecanismo para explicar o processo eletródico do etanotiol na superfície do ouro é sugerido e mais adiante discutido.

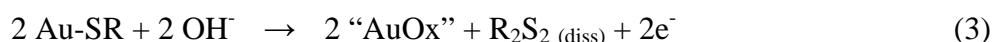
Os picos 1 e 2 correspondem à oxidação do Au {110} e Au {111} para ouro-tiolato, respectivamente (reação 1):



O pico 3 corresponde à oxidação do etanotiol em solução para ditiol (reação 2):



O pico 4 corresponde à oxidação do ouro-tiolato para ditiol e a formação de óxido de ouro (reação 3):



O pico 5 corresponde à redução das espécies de óxido de ouro para ouro (WIERSE et al., 1978):



Os picos 6 e 7 corresponde à dessorção redutiva do tiol em Au {111} e Au {110}, respectivamente (reação 5):

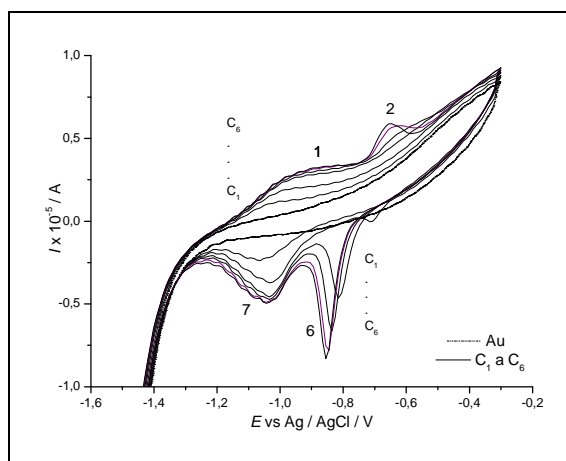


Lezna e colaboradores (1990) obtiveram voltamogramas similares quando estudaram eletroadsorção de sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) em eletrodo de ouro em meio alcalino. Eles afirmaram que no caso de reações entre sulfeto e ouro, há pelo menos duas regiões distintas observáveis nos voltamogramas: (i) eletroadsorção de sulfeto (em baixos potenciais) e (ii) a formação de multicamadas e o aparecimento de espécies solúveis (em altos potenciais) (LEZNA et al.,1990). WIERSE e colaboradores (1978) estudaram o comportamento do  $\text{Na}_2\text{S}$  em solução e descreveram o pico 3 como relacionado a oxidação dos íons sulfeto e o pico 4 à oxidação de  $\text{SO}_4^{2-}$  (WIERSE et al.,1978).

Em nossos estudos, acreditamos que com etanotiol em solução os picos são referentes aos seguintes fenômenos:

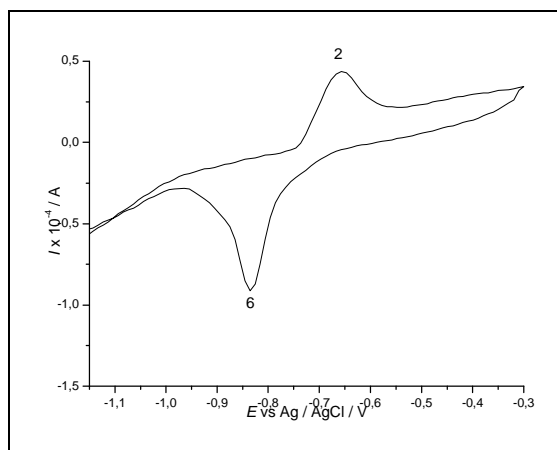
Os picos 1 e 2 representam a oxidação do Au {110} e Au {111} para ouro-tiolato, respectivamente (reação 1). Utilizando eletrodo policristalino não é possível afirmar exatamente qual pico se refere a cada tipo de Au, como pode ser visto na figura 5. Nesse caso é possível apenas observar que esses picos são largos e com baixos valores de corrente. Os

valores de corrente para o pico 1 e 7 aumentam com a concentração de etanotiol em solução desde a primeira adição, mas o pico 6 começa a aparecer somente após a segunda adição de etanotiol. Pode se observar também o deslocamento do pico 6 para potenciais mais negativos com o aumento da concentração de etanotiol no meio. O pico 2 pode ser visualizado a partir da quarta adição que é onde valores de corrente dos picos 1 e 7 não aumentam mais com a concentração. O completo recobrimento do eletrodo inicia com a adição 5 (0,40 mM) mantendo constante os valores de correntes para os 4 picos.



**Figura 5** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro policristalino (--) em solução alcalina (NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) com etanotiol ( $C_1= 0,08 \text{ mM}$ ,  $C_2= 0,16 \text{ mM}$ ,  $C_3= 0,24 \text{ mM}$ ,  $C_4= 0,32 \text{ mM}$ ,  $C_5= 0,40 \text{ mM}$  e  $C_6= 0,48 \text{ mM}$ . Condições experimentais:  $E_{\text{inicial}}:-1,5 \text{ V}$ ,  $E_{\text{inversão}}: -0,3 \text{ V}$ ,  $\nu = 400 \text{ mV s}^{-1}$ .

Para distinguir qual tipo de ouro é correspondente a cada pico, o mesmo experimento foi realizado com eletrodo de ouro monocristalino (Au {111}), e o voltamograma pode ser visualizado na figura 6.



**Figura 6** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de monocristalino Au{111} com etanotiol (0,6 mM) em solução alcalina (NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Condições experimentais:  $E_{\text{inicial}}:-1,15 \text{ V}$ ,  $E_{\text{inversão}}: -0,3 \text{ V}$ ,  $\nu = 400 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como pode ser observado na figura 6, utilizando-se eletrodo monocristalino do tipo Au {111}, é possível visualizar apenas os picos 6 e 2 que correspondem à redução e oxidação do Au {111} para ouro-tiolato, respectivamente. Sendo assim, os picos 7 e 1 correspondem à redução e oxidação do Au {110} para ouro-tiolato, respectivamente (HASSE et al., 2012).

Yang e colaboradores (1996) encontraram também em potenciais negativos, dois picos de redução de tiolato usando eletrodo de ouro policristalino. Experimentos similares foram realizados com eletrodos monocristalinos do tipo Au {111} e Au {110} e pode-se concluir que o pico mais negativo é referente à Au {110} e o mais positivo é referente ao Au {111}. Estas semelhanças sugerem que os valores de ponto de carga zero para diferentes orientações cristalográficas das superfícies de ouro podem ser utilizados para prever que a remoção redutiva do tiol irá ocorrer a um potencial mais negativo sobre a superfície de Au {110} do que em superfície com Au {111}.

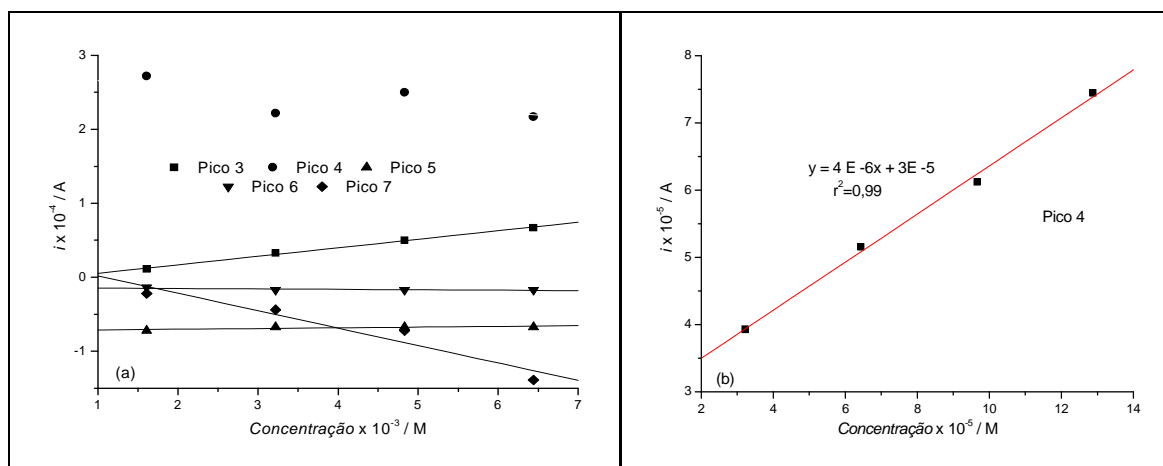
O pico 3 representa a formação de ditiol originado das espécies dissolvidas a partir do ouro (reação 2). Isto é suportado por dados experimentais que mostram que com o aumento da concentração de etanotiol em solução, os valores de corrente deste pico aumentam linearmente (ver figura 7).

Na reação 3 (pico 4) o tiolato é oxidado para ditiol e “óxido de ouro” é formado (WIERSE et al., 1978). Como pode ser observado na figura 7a, altas concentrações (1,61 a 6,44 mM) não influenciam os valores de corrente do pico devido ao completo recobrimento da superfície do eletrodo. Contudo, valores de concentração menores do que 0,12 mM apresentaram dependência linear com os valores de corrente de pico (figura 7b).

No caso do pico 5 (reação 4), o valor da corrente de pico é menor quando etanotiol não está presente na superfície do eletrodo de ouro. A razão é que apenas óxido de ouro é reduzido neste potencial, enquanto que o ouro-tiolato é reduzido apenas em potenciais mais negativos referentes aos picos 6 e 7. Isto está de acordo com os resultados de Yang e colaboradores (1996), que mostraram que quando tiol quimissorvido está presente na superfície, a corrente associada com a formação do óxido de ouro é consideravelmente atenuada, mas não há explicação conclusiva para este fenômeno como um todo. Este pico permanece constante com o aumento da concentração de etanotiol na solução (ver figura 7).

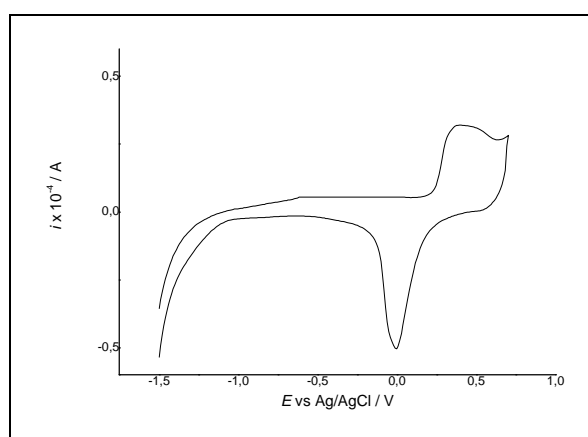
A reação 5 (pico 6 e 7) corresponde a dessorção catódica do tiolato (ZHONG et al., 1997) observada nos picos 6 e 7 para Au {111} e Au {110}, respectivamente. Isso implica na redução do ouro tiolato para ouro e na perda do tiolato a partir da superfície do eletrodo (WIDRIG et al., 1991, YANG et al., 1996). Como pode ser observado na figura 7a, o pico 7 aumenta linearmente com a concentração de etanotiol no meio. Yang e colaboradores (1996)

encontraram 2 picos de desorção redutiva do tiol em eletrodo policristalino de ouro e estes picos apresentam potencial de  $-1,04$  V em superfícies de Au {111} e em  $-1,27$  V em superfícies de Au {110} sob condições semelhantes. Como discutido anteriormente, essas informações podem ser utilizadas para prever que a remoção redutiva de tiol irá ocorrer em potenciais mais negativos em superfícies de Au {110} do que em superfícies de Au {111}.



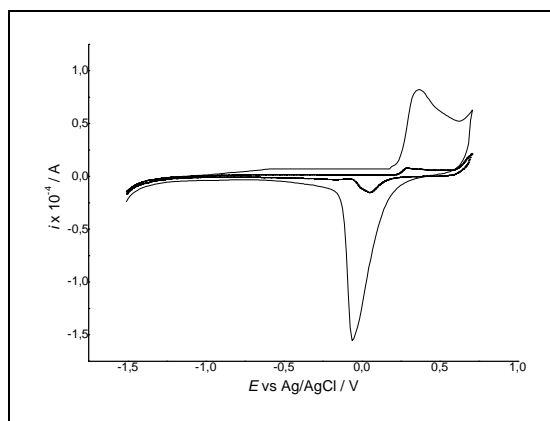
**Figura 7** – Dependência dos valores de corrente e concentração com velocidade varredura de  $1200 \text{ mV s}^{-1}$ . Faixa de concentração: 1,61 a 6,44 mM (a) e 0,03 a 0,12 mM (b).

Para provar nossos pressupostos, o eletrodo de ouro foi recoberto com etanotiol em uma célula (pré-tratamento eletroquímico) e, posteriormente, a voltametria cíclica foi realizada em outra célula com eletrólito puro (sem a presença de etanotiol). Como pode ser visualizado na figura 8, a ausência do pico 3 está de acordo com nossa sugestão de que este pico é oriundo do etanotiol em solução. Também não se pode observar os picos 6 e 7, porque o Au-SR presente na superfície do ouro foi removido no potencial positivo ( $+0,55$  V).



**Figura 8** – Voltamograma cíclico de eletrodo de ouro recoberto com etanotiol (6,44 mM) em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). ( $t_{pt} = 30 \text{ s}$ ;  $E_{pt} = -1,5 \text{ V}$ ;  $E_{inicial} = -1,5 \text{ V}$ ,  $E_{inversão} = 0,7 \text{ V}$ ,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ ).

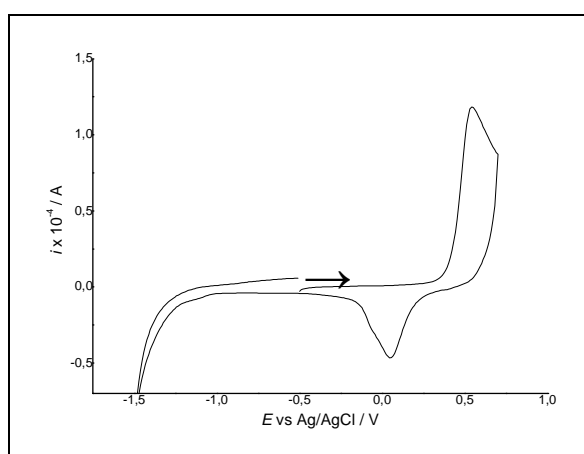
O mesmo experimento foi realizado com velocidades de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e  $1200 \text{ mV s}^{-1}$ , como pode ser visualizado na figura 9 (o pré-tratamento eletroquímico foi realizado em uma célula voltamétrica e a medida em outra célula).



**Figura 9** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro recoberto com etanotiol 3.22 mM, em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) com diferentes velocidades de varredura (... )  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , (–)  $1200 \text{ mV s}^{-1}$ . ( $t_{\text{pt}}$ : 30 s.  $E_{\text{pt}}$ : -1,5 V,  $E_{\text{inicial}}$ :-1,5 V,  $E_{\text{inversão}}$ : 0,7 V).

O comportamento eletroquímico mostrado na figura 9 é semelhante ao da figura 8. A diferença entre os dois está apenas nos diferentes valores de corrente dos picos que é explicada pelas diferentes velocidades de varredura utilizadas.

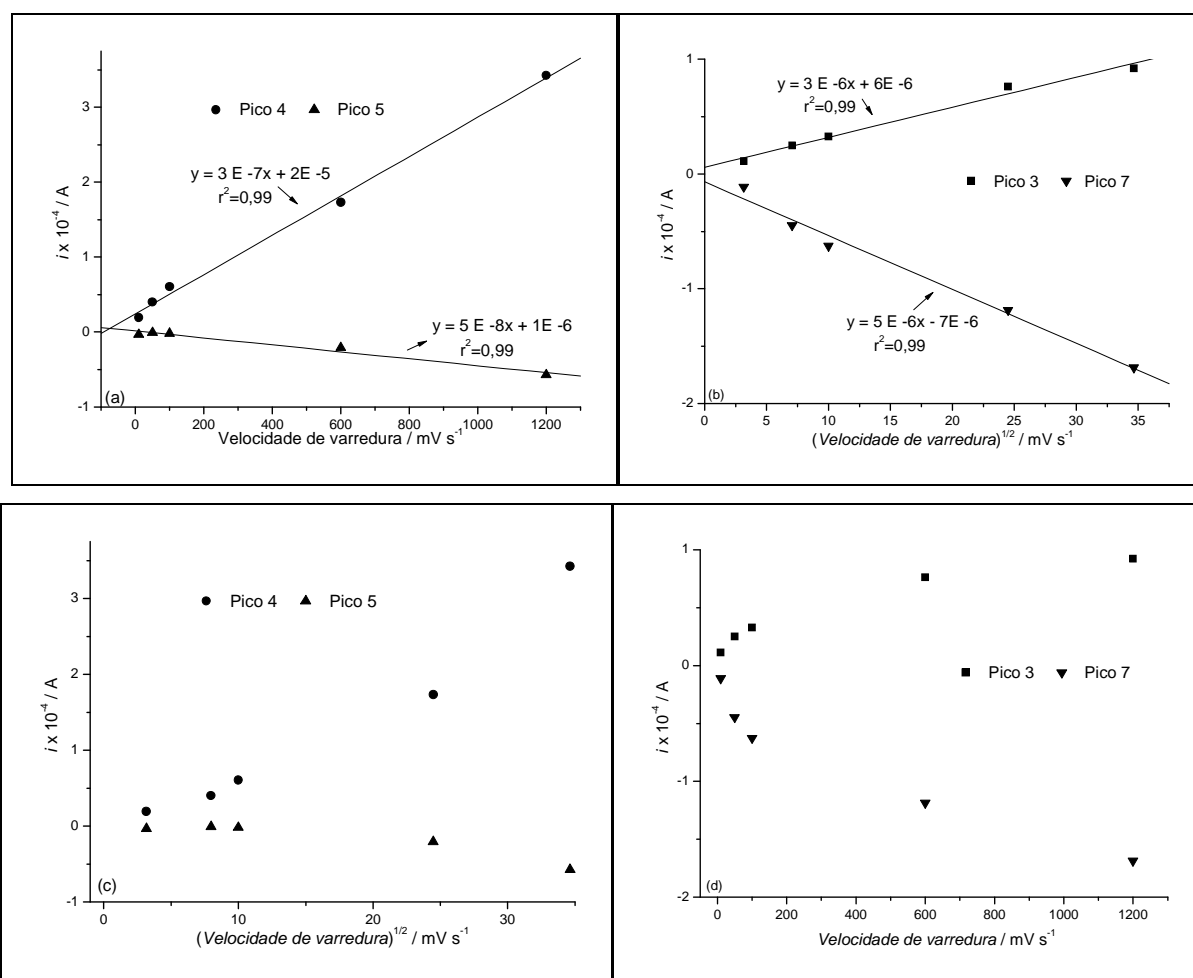
A seguir (figura 10) está demonstrado experimento similar, utilizando apenas um diferente potencial de pré-tratamento (- 0,5 V).



**Figura 10** – Voltamograma cíclico de eletrodo de ouro recoberto com etanotiol (6,44 mM) em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). ( $t_{\text{pt}}$ = 30 s;  $E_{\text{pt}}$  = -0,5 V;  $E_{\text{inicial}}$ :-0,5 V,  $E_{\text{inversão}}$ : 0,7 V,  $v$  =  $600 \text{ mV s}^{-1}$ ).

Neste caso, também se pode observar comportamento voltamétrico semelhante ao dos experimentos que utilizaram potencial de pré-tratamento de -1,5 V. Contudo, o potencial do pico 4 foi deslocado positivamente (similarmente ao resultado apresentado na figura 4), porque a medida eletroquímica foi iniciada em -0,5 V, e sendo assim ainda há Au-SR na superfície do eletrodo que será oxidado no potencial positivo (+0,55 V).

A figura 11 retrata a dependência da velocidade de varredura com os valores de corrente dos picos 3, 4, 5 e 7.



**Figura 11** – Dependência dos valores de corrente dos picos 3, 4, 5 e 7 com a velocidade de varredura (a e d) e a raiz quadrada da velocidade de varredura (b e c). (concentração de etanotiol = 6.44 mM).

Como pode ser observado e como já foi mencionado anteriormente, os valores de correntes de pico decrescem com a diminuição da velocidade de varredura. Em outros estudos com compostos de enxofre esta relação também foi observada (ZHONG et al., 1997; VERICAT et al., 2004). A relação entre a corrente de pico e a velocidade de varredura ou raiz quadrada da velocidade de varredura é um instrumento bem conhecido para examinar a

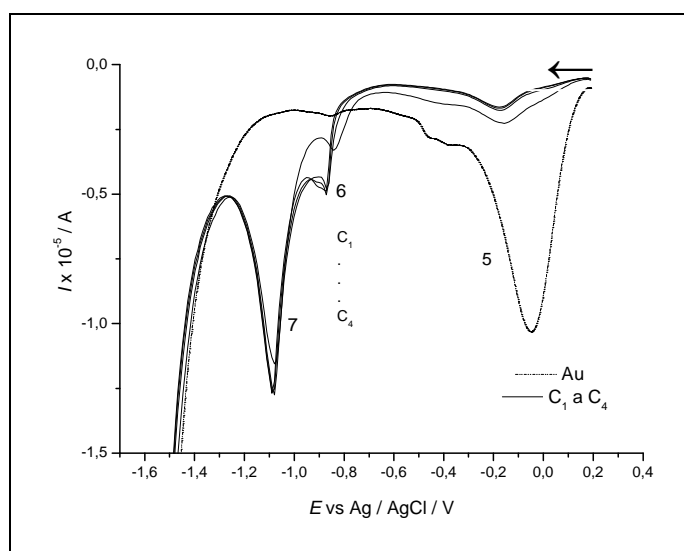


cinética das reações no eletrodo. Como pode ser visto nas figuras 11a e 11c, os valores de corrente dos picos 4 e 5 variam linearmente com a velocidade de varredura, mas não com a raiz quadrada desta velocidade e isto corresponde a comportamento de monocamada. Os valores de corrente dos picos 3 e 7 aumentam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, mas não com a velocidade de varredura, indicando cinética de difusão controlada e cinética de difusão limitada por redissolução, respectivamente, como pode ser observado nas figuras 11b e 11d.

### 5.1.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Para investigar os procedimentos no eletrodo mais rigorosamente, a voltametria de pulso diferencial também foi utilizada.

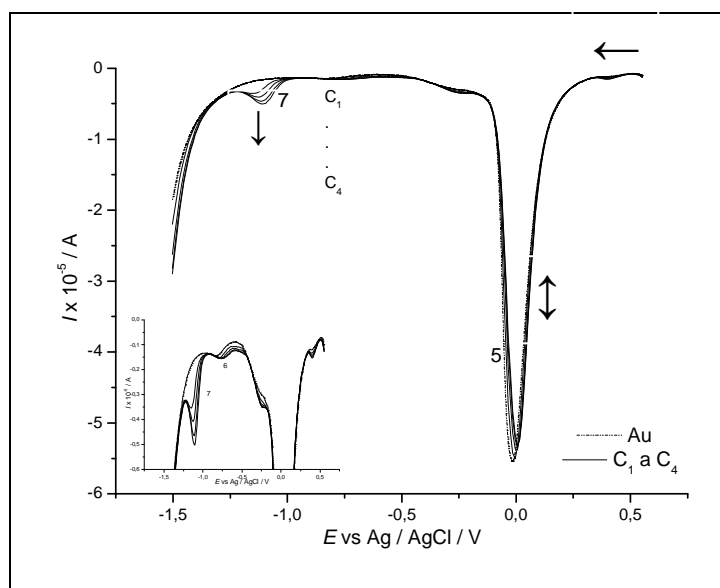
A figura 12 mostra voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de ouro (linha pontilhada - sem etanotiol) em solução alcalina, obtidos utilizando potencial de pré-tratamento correspondente ao potencial padrão do pico 3 (0,19 V), durante 300 segundos a uma velocidade de varredura de  $600 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 12** – Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) com etanotiol ( $C_1$ )  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , ( $C_2$ )  $10 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $C_3$ )  $15 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $C_4$ )  $20 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Condições experimentais:  $t_{\text{pt}}$ : 300 s,  $E_{\text{pt}}$ : 0,19 V,  $E_{\text{inicial}}$ : 0,19 V,  $E_{\text{final}}$ : -1,5 V, amplitude do pulso = 0,025 V, tempo do pulso = 0,016 s,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ .

Quando foi aplicado o potencial de 0,19 V no eletrodo de ouro sem etanotiol em solução, o pico 5 pode ser visualizado porque neste potencial ocorre uma pequena formação de “AuOH” e os picos 6 e 7 não puderam ser observados porque não há etanotiol em solução ou na superfície do eletrodo. Depois da adição de etanotiol é possível observar uma quase completa diminuição do pico 5, mas ainda há a presença de um pouco de “AuOx”. Pode ser observada a formação dos picos 6 e 7 devido a redução de Au-SH presente na superfície do eletrodo, há também a presença de etanotiol na solução. Não há aumento dos valores de corrente desses picos quando mais etanotiol foi adicionado na solução, indicando o completo recobrimento do eletrodo.

Com etanotiol em solução e usando potencial de pré-tratamento igual ao potencial do pico 4 ( $E_{pt} = 0,55$  V,  $t_{pt} = 300$  s,  $v = 600$  mV s<sup>-1</sup>), houve uma pequena mudança nos valores de corrente do pico 5, como pode ser observado na figura 13. Com esse potencial de pré-tratamento, não há tiol na superfície do eletrodo, mas pode ser observado o pico 7 porque há etanotiol em solução acarretando assim a dessorção redutiva do tiolato (reação 5).

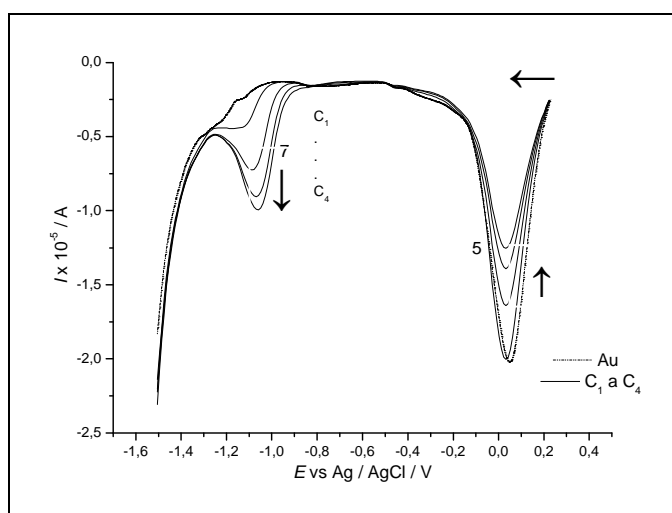


**Figura 13** – Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de ouro em solução alcalina (NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>) com etanotiol (C<sub>1</sub>) 5x10<sup>-5</sup> M, (C<sub>2</sub>) 10x10<sup>-5</sup> M (C<sub>3</sub>) 15x10<sup>-5</sup> M (C<sub>4</sub>) 20x10<sup>-5</sup> M. Condições experimentais:  $t_{pt}$ : 300 s,  $E_{pt}$ : 0,55 V,  $E_{inicial}$ : 0,55 V,  $E_{final}$ : -1,5 V, amplitude do pulso = 0,025 V, tempo do pulso = 0,016 s,  $v = 600$  mV s<sup>-1</sup>.(figura inserida: mesma figura 13, porém com escala menor)

Além disso, pode ser observada grande formação de óxido de ouro (pico 5 e reação 4) porque o potencial de pré-tratamento é muito mais positivo do que o potencial de oxidação do

ouro puro. Os valores de corrente do pico 7 (dessorção de Au-SH - reação 5) aumentam com a adição de etanotiol.

Quando foi aplicado o potencial de pré-tratamento entre os picos 3 e 4 ( $E = 0,3 \text{ V}$ ,  $t_{pt} = 300 \text{ s}$ ,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ ), houve o aumento dos valores de corrente do pico 7 porque além de haver tiol na superfície do eletrodo mais etanotiol está sendo adicionado na solução (figura 14). Sendo assim, mais Au-SR e menos óxido de ouro serão reduzidos, acarretando a diminuição dos valores para o pico 5.



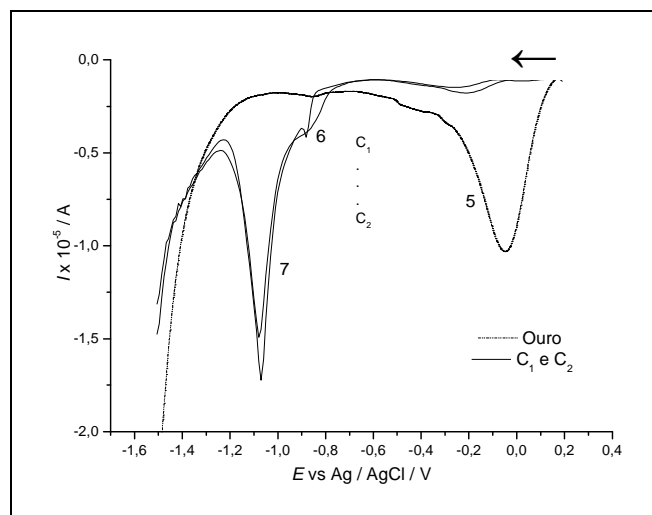
**Figura 14** – Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) com etanotiol ( $C_1$ )  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , ( $C_2$ )  $10 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $C_3$ )  $15 \times 10^{-5} \text{ M}$  ( $C_4$ )  $20 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Condições experimentais:  $t_{pt}$ : 300 s,  $E_{pt}$ : 0,3 V,  $E_{inicial}$ : 0,3 V,  $E_{final}$ : -1,5 V, amplitude do pulso = 0,025 V, tempo do pulso = 0,016 s,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ .

Nesse caso ocorre a formação de uma menor quantidade de “AuOx” do que quando foi usado potencial de pré-tratamento de 0,55 V. Consequentemente, o pico 5 na figura 14 é menor que na figura 13.

Assim como foi realizado na voltametria cíclica, para medidas usando voltametria de pulso diferencial, o eletrodo de ouro foi recoberto com tiol em uma célula (pré-tratamento eletroquímico) e a medida voltamétrica foi realizada em outra célula com eletrólito puro (sem a presença de etanotiol), como pode observado nas figuras 15, 16 e 17. Estes resultados estão de acordo com os anteriores (figuras 12, 13 e 14) onde o etanotiol estava em solução, fortalecendo o pressuposto mencionado.

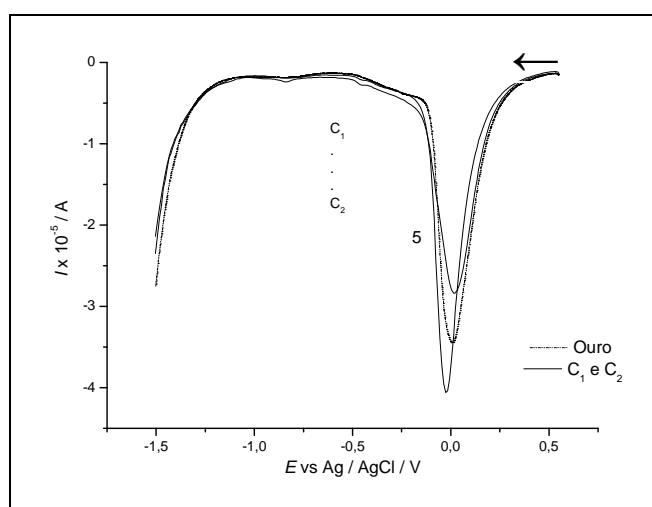
A figura 15 mostra que o voltamograma apresentou o mesmo comportamento mostrado na figura 12. Houve o desaparecimento quase completo do pico 5, mas podem ser

observados os picos 6 e 7 (dessorção redutiva do tiolato) que nesse potencial de pré-tratamento não pode ser removido da superfície do eletrodo. Também pode ser observado o total recobrimento da superfície do eletrodo de ouro.



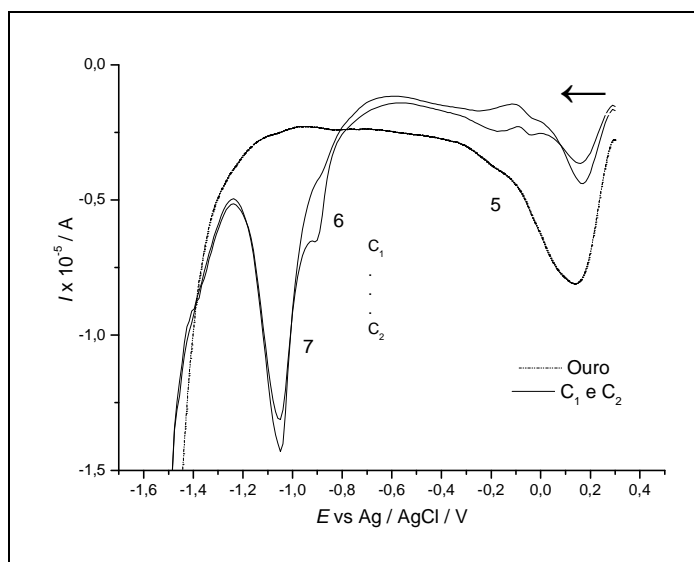
**Figura 15** – Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) recoberto com etanotiol ( $\text{C}_1$ )  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  e ( $\text{C}_2$ )  $20 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Condições experimentais:  $t_{\text{pt}}$ : 300 s,  $E_{\text{pt}}$ : 0,19 V,  $E_{\text{inicial}}$ : 0,19 V,  $E_{\text{final}}$ : -1,5 V, amplitude do pulso = 0,025 V, tempo do pulso = 0,016 s,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ .

Quando foi aplicado o potencial de 0,55 V, o tiolato foi removido da superfície do eletrodo não sendo possível observar o pico 7, mas pode ser observado o pico 5 referente a “AuOx” (figura 16).



**Figura 16** – Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) recoberto com etanotiol ( $\text{C}_1$ )  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  e ( $\text{C}_2$ )  $20 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Condições experimentais:  $t_{\text{pt}}$ : 300 s,  $E_{\text{pt}}$ : 0,19 V,  $E_{\text{inicial}}$ : 0,55 V,  $E_{\text{final}}$ : -1,5 V,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ .

Quando foi aplicado o potencial de 0,3 V (figura 17), o tiolato não foi removido da superfície do eletrodo sendo possível observar os picos 6 e 7.



**Figura 17** – Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) recoberto com etanotiol ( $\text{C}_1$ )  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  e ( $\text{C}_2$ )  $20 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Condições experimentais:  $t_{\text{pt}}$ : 300 s,  $E_{\text{pt}}$ : 0,3 V,  $E_{\text{inicial}}$ : 0,3 V,  $E_{\text{final}}$ : -1,5 V, amplitude do pulso = 0,025 V, tempo do pulso = 0,016 s,  $v$  = 600  $\text{mV s}^{-1}$ .

O pico 5 apresentou diminuição dos valores de corrente porque com esse potencial de pré-tratamento há a competição entre a formação de AuSH e “AuOx” devido a oxidação do ouro para óxido de ouro.

### 5.1.2 Ataque de radicais OH em eletrodo de ouro recoberto com etanotiol

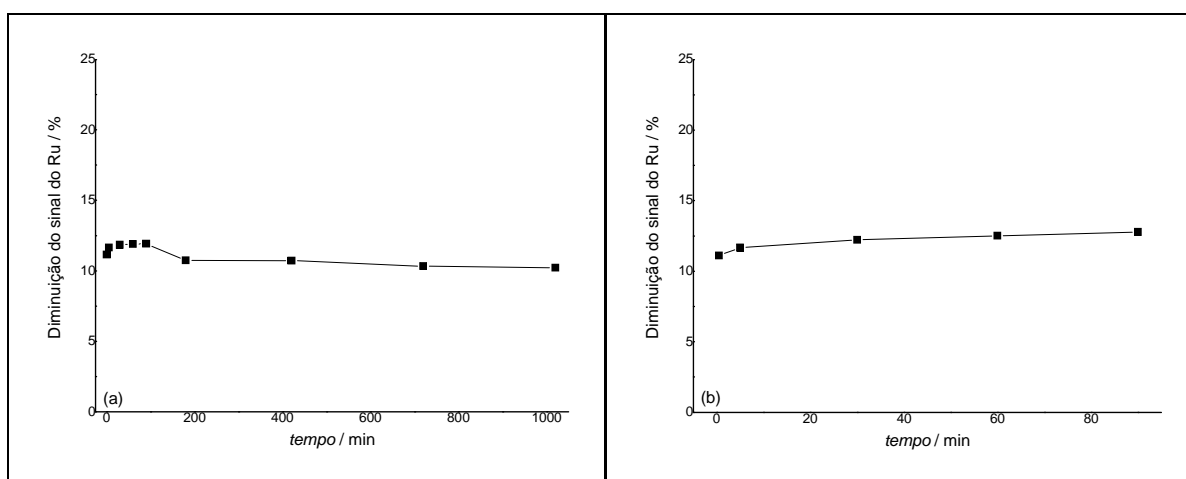
Como pode ser visto em muitos experimentos, os valores de corrente dos sinais voltamétricos não aumentam com valores de concentração crescentes de etanotiol, demonstrando assim a saturação da superfície do eletrodo.

Sendo assim, nesta parte do trabalho submeteu-se o eletrodo de ouro a diferentes tempos de agitação (com contínua agitação do eletrodo) e variáveis valores de concentração de etanotiol ( $5 \times 10^{-5}$  e 0,0161 M), seguida da medida voltamétrica do rutênio neste mesmo eletrodo. Com isso, pode-se afirmar qual a porcentagem que o eletrodo de ouro está recoberto com etanotiol.

O primeiro passo foi obter uma medida padrão de rutênio 1 mM em tampão acetato 0,01 M (SCHOLZ et al., 2007) (sem etanotiol depositado na superfície do eletrodo) representando uma superfície totalmente livre de tiol. Quando se tem uma medida com apenas rutênio, o pico corresponde a 100% do ouro disponível. Quando o eletrodo foi previamente recoberto com etanotiol, deve-se fazer o cálculo para saber quanto da superfície está coberta com etanotiol e qual a porcentagem da diminuição do sinal do rutênio quando há etanotiol na superfície do eletrodo.

Duas variáveis foram estudadas: concentração de etanotiol e tempo de agitação do eletrodo.

Para estudar a interferência do tempo de contato do etanotiol na adsorção e recobrimento do eletrodo de ouro, este foi submetido à diferentes tempos de agitação com concentrações fixas de  $5 \times 10^{-5}$  e 0,0161 M, como pode ser visualizado nas figuras 18a e 18b, respectivamente.

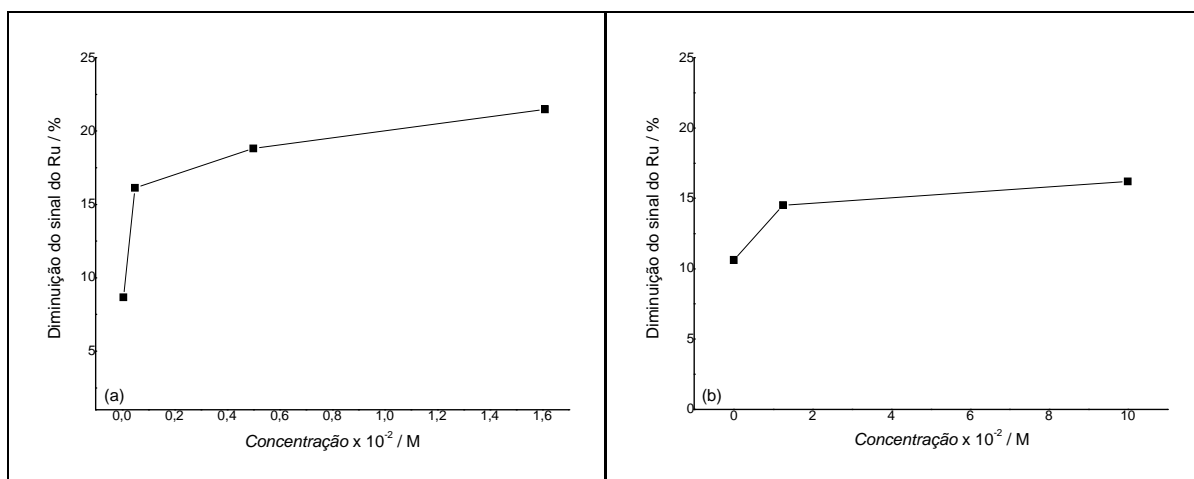


**Figura 18** – Relação entre tempo de adsorção (min) do eletrodo em solução contendo  $5 \times 10^{-5}$  (a) e 0,0161 M de etanotiol e porcentagem da diminuição do sinal do rutênio.

Como pode ser observado na figura 18a, quando o eletrodo permanece submerso em solução de etanotiol com concentração de  $5 \times 10^{-5}$  M sob agitação constante, o máximo de recobrimento da superfície do eletrodo foi cerca de 13%. Após 90 minutos de agitação, a porcentagem de recobrimento diminuiu e permaneceu constante, até o tempo máximo de agitação estudado (1020 minutos). Já na figura 18b pode-se observar que com valor de concentração de 0,0161 M, o máximo de recobrimento do eletrodo com etanotiol fica em torno de 12% e este valor se mantém constante e independente do tempo de agitação. Sendo

assim, pode-se afirmar que para estas concentrações, o tempo que o eletrodo permanece em agitação em contato com etanotiol, não influencia no recobrimento do eletrodo.

Para estudar o efeito da concentração no recobrimento do eletrodo, submeteu-se o eletrodo a concentrações de etanotiol variáveis com tempos de agitação fixos de 5 minutos e 24 horas, como pode ser visualizado nas figuras 19a e 19b respectivamente.



**Figura 19** – Relação entre concentração de etanotiol adsorvido submetida à adsorção do eletrodo durante 5min (a) e 24 h (b) e porcentagem da diminuição do sinal do rutênio.

Como podem ser observados na figura 19a, com 5 minutos de agitação do eletrodo em concentrações crescentes de etanotiol, os valores de diminuição do sinal do rutênio aumentam em relação ao estudo realizado na figura 18. Para o tempo de agitação de 24 horas (figura 19b) utilizou-se concentrações de etanotiol maiores, mas os valores de porcentagem de recobrimento foram menores que 17%. Quando se utilizou a solução 0,005 e 0,0161 M (5 min de agitação) as diminuições do sinal do rutênio foram de 18,8 e 21,5%, respectivamente. Para a concentração de 0,0125 e 0,1 M de etanotiol (24 horas de agitação) obtiveram-se valores de diminuição do sinal do rutênio de 14,5 e 16,1%, respectivamente.

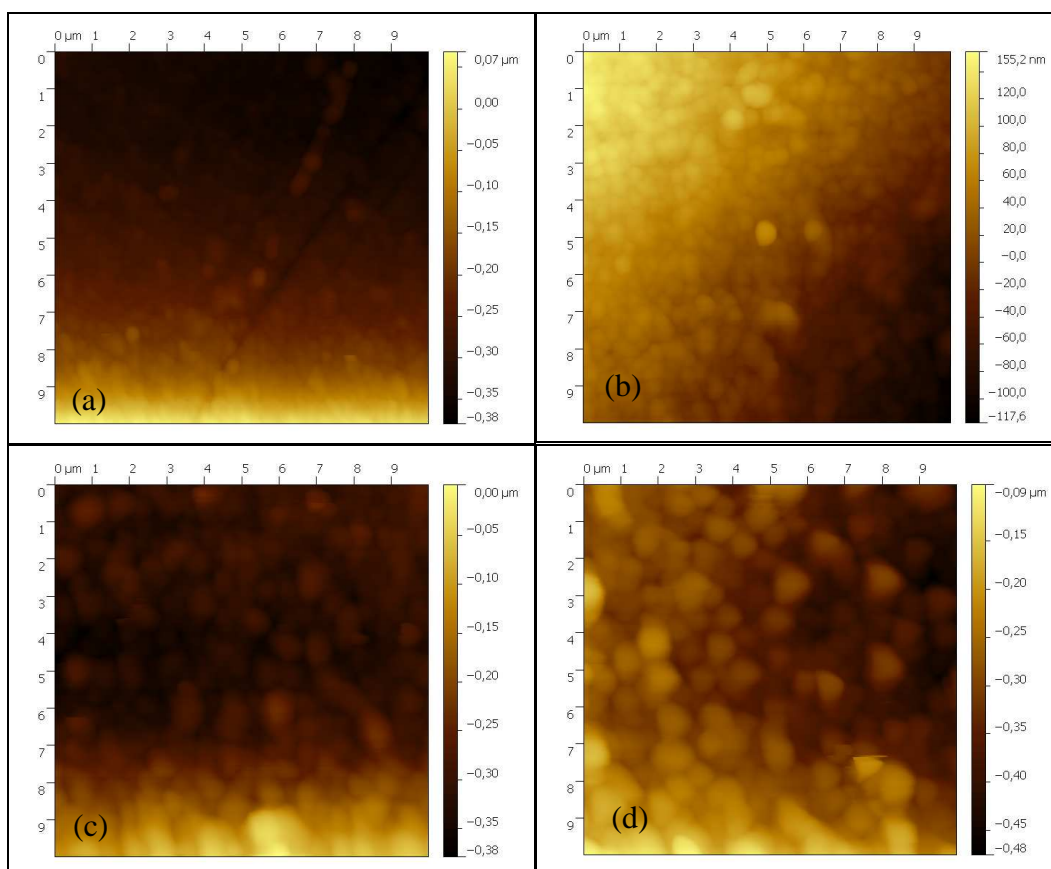
Pode-se então afirmar, que o etanotiol se adsorve na superfície do eletrodo de ouro mesmo em concentrações baixas ou tempo de contato curto. Sabendo-se que o tiol pode se adsorver facilmente na superfície do eletrodo de ouro, a dessorção do tiol também irá ocorrer. Sendo assim, faz-se necessário saber se durante a dessorção do composto, ocorre ou não a remoção do ouro.

Para isso, nesta parte do trabalho submeteu-se o eletrodo de ouro à formação de monocamadas compactas e bem ordenadas em solução etanólica de etanotiol 1 mM por 24 horas e após submeteu-se o eletrodo a irradiação UV por 30 minutos numa temperatura de

60 °C em solução H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9/1). Este experimento foi realizado 30 vezes, sempre na mesma solução e após foram realizadas medidas de Au<sup>3+</sup> por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) e SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> por Cromatografia Iônica (IC, do inglês *Ionic Chromatography*). Foram determinadas concentrações de 0,1015 10<sup>-4</sup> mM Au e 0,1928 mM SO<sub>x</sub><sup>-2</sup>.

Com esses resultados pode-se afirmar que o ataque radicalar OH<sup>•</sup> na superfície do eletrodo, remove o tiolato da superfície, mas também remove ouro em pequenas quantidades durante este tempo de exposição do eletrodo frente a este radical livre.

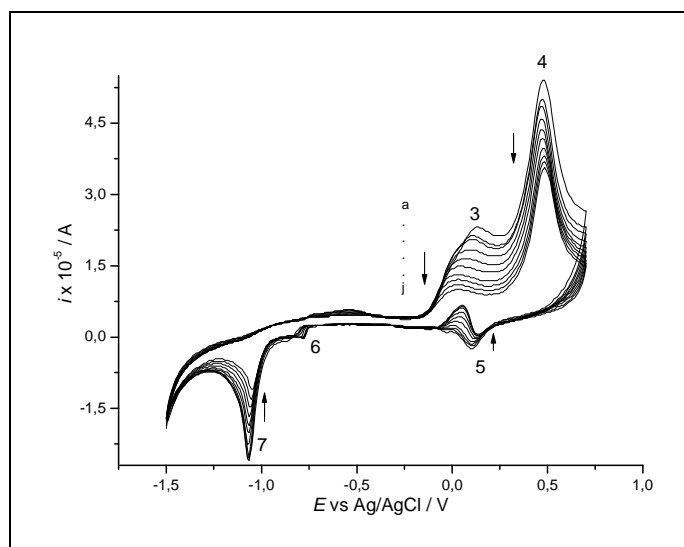
Para mostrar as alterações morfológicas do eletrodo de ouro policristalino em contato com etanotiol, o eletrodo foi submetido a 1000 ciclos em solução etanotiólica (6,44 mM) e a cada 100 ciclos foram obtidas imagens de AFM, como podem ser observadas na figura 20. Nestas imagens é possível visualizar a diferença de morfologia do eletrodo na medida em que o mesmo foi submetido a um número maior de ciclos.



**Figura 20** – Imagens de AFM *ex situ* de eletrodo de ouro policristalino após polimento e ciclos com etanotiol 6,44 mM em solução alcalina (a, b, c e d = 100, 500, 750 e 1000 ciclos respectivamente). Condições da voltametria cíclica: faixa de varredura = -1,5 e 0,6 V,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , eletrólito = NaOH 0,5 M.



Na figura 21 pode ser observado o perfil voltamétrico do eletrodo de ouro com etanotiol em solução, durante os ciclos realizados para a obtenção das imagens de AFM (figura 20).

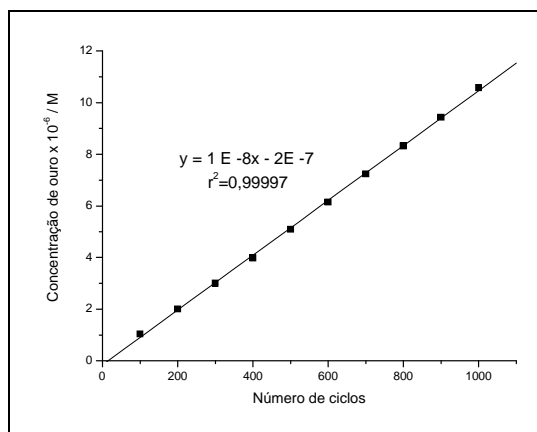


**Figura 21** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) com etanotiol (6,44 mM) em diferentes ciclos (a=100, b=200, c=300, d=400, e=500, f=600, g=700, h=800, i=900 e j=1000 ciclos). Condições experimentais:  $E_{\text{inicial}}: -1,5 \text{ V}$ ,  $E_{\text{inversão}}: 0,7 \text{ V}$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como podem ser observados na figura 21, os valores de corrente dos picos 3, 4, 5 e 7 diminuem com o aumento da quantidade de ciclos. Estas diminuições dos sinais podem estar relacionadas com a perda de ouro ou até mesmo com a alteração da morfologia do eletrodo após a sequência de ciclos a qual o mesmo foi submetido.

Para esclarecer essa questão, o eletrodo foi submetido a uma nova sequência de ciclos em solução alcalina contendo etanotiol (6,44 mM) e a cada 100 ciclos a solução foi recolhida e foi realizada a medida de  $\text{Au}^{3+}$  por ICP-OES.

Na figura 22 pode ser visualizada a relação entre a concentração de ouro que foi removido do eletrodo, com o número crescente de ciclos aplicados.



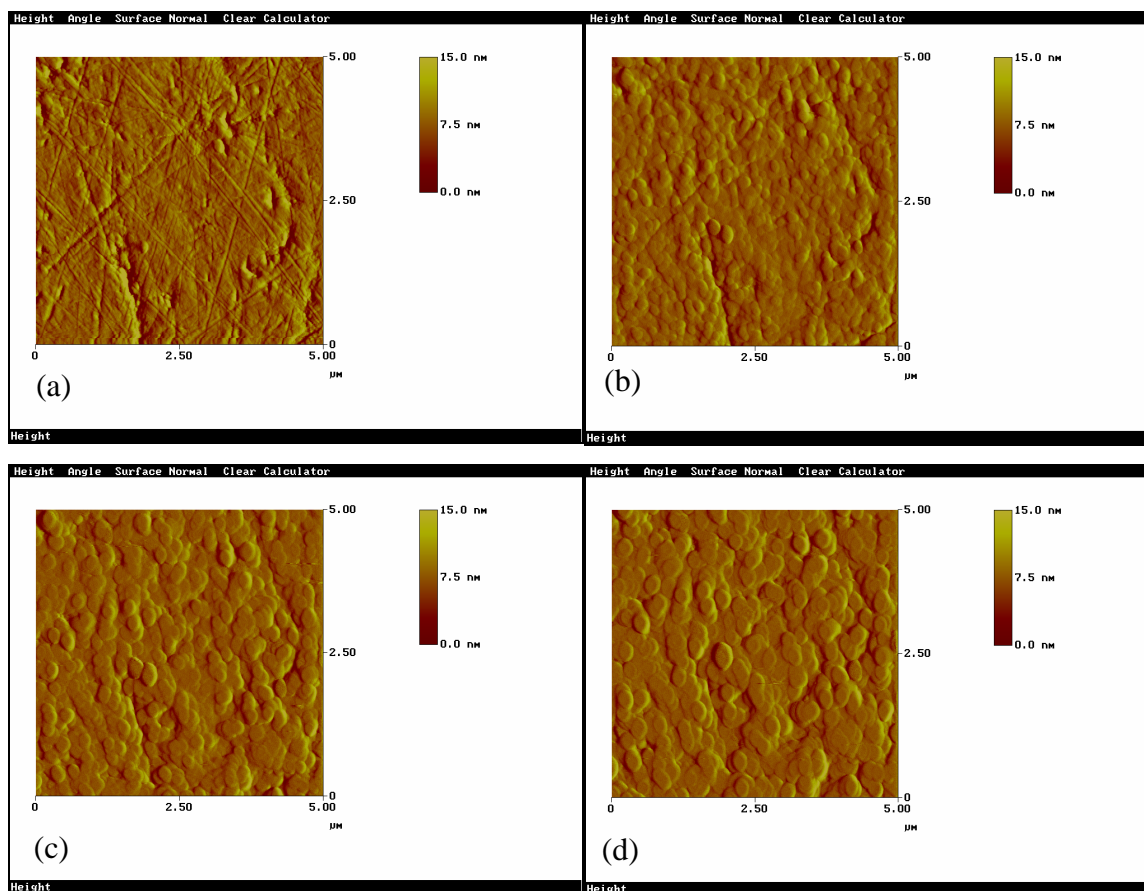
**Figura 22** – Dependência dos números de ciclos versus a concentração de ouro determinada

Como pode ser visualizado na figura 22, há a perda de ouro com o decorrer dos ciclos realizados em meio alcalino contendo solução de etanotiol. A perda de  $\text{Au}^{3+}$  é praticamente a mesma a cada 100 ciclos, apresentando assim uma relação linearmente crescente à medida que o eletrodo de ouro foi submetido a mais ciclos.

### 5.1.3 Mudanças morfológicas de superfície de ouro e suas influências em processos electrocatalíticos

#### 5.1.3.1 Influência *in situ* da voltametria cíclica e de aplicação de potenciais anódicos e catódicos na morfologia de eletrodo de ouro policristalino em solução alcalina.

A morfologia do eletrodo de ouro policristalino foi estudada em solução alcalina utilizando medidas *in situ* por AFM. A figura 23 mostra as imagens de AFM de eletrodo de ouro policristalino após polimento (a) e em seguida após diferentes ciclos (b,c,d).



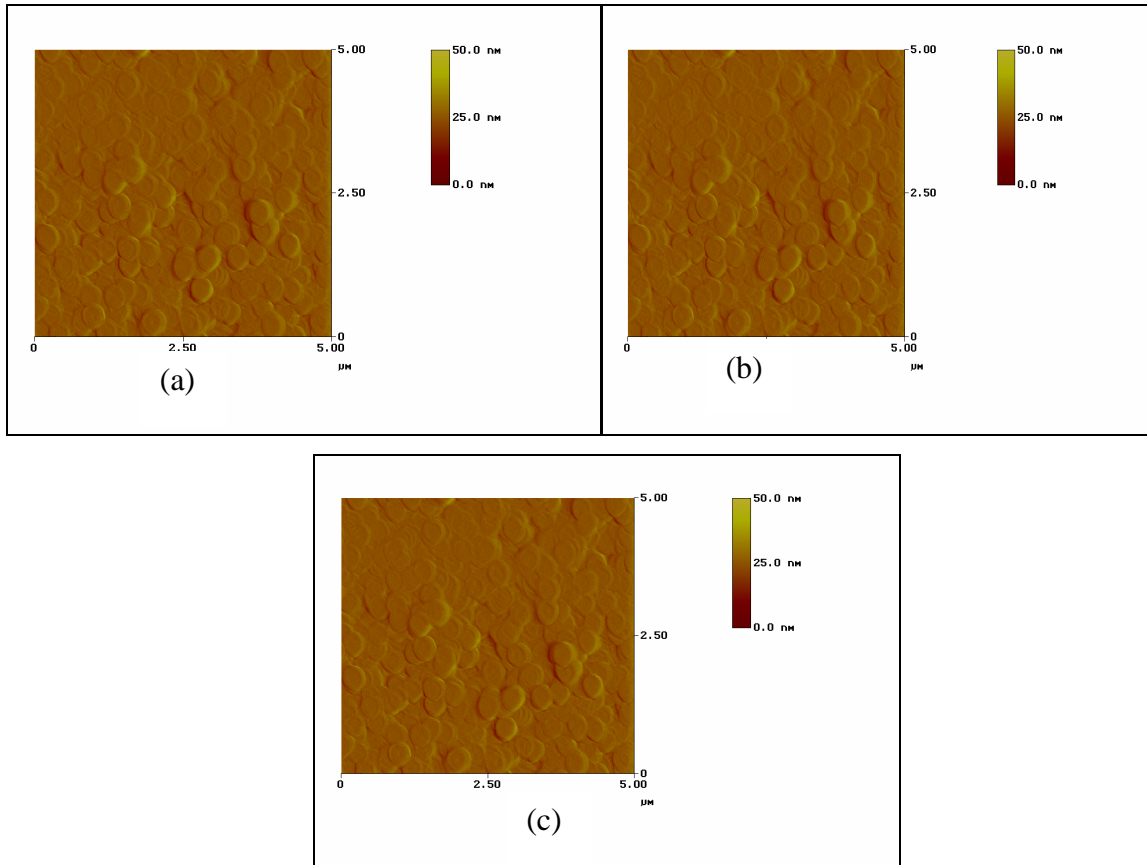
**Figura 23** – Imagens de AFM *in situ* de eletrodo de ouro policristalino após polimento (a) e após ciclos em solução alcalina (b, c e d = 250, 500 e 750 ciclos respectivamente). Condições da voltametria cíclica: faixa de varredura = -0,5 e 0,6 V,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , eletrólito = NaOH 0,5 M.

Como pode se observar na figura 23 há o aumento na rugosidade da superfície do eletrodo de ouro com o aumento de número de ciclos em solução alcalina. Neste caso é difícil definir se esse aumento da rugosidade do eletrodo de ouro ocorre devido à aplicação de potencial anódico (+) ou catódico (-), porque na voltametria cíclica foi realizada em ambos os sentidos.

Para esclarecer essa questão, ao invés de utilizar a varredura cíclica tradicional, optou-se por utilizar saltos do potencial catódico (-0,5 V) para o anódico (0,6 V) mantendo-se alguns segundos em cada potencial, 750 vezes.

Inicialmente manteve-se tanto o potencial anódico quanto o catódico por 1 segundo (tratamento A). Após manteve-se o potencial catódico por 3 segundos e o potencial anódico por 1 segundo (tratamento B). Por último manteve-se o potencial catódico por 1 segundo e o potencial anódico por 3 segundos (tratamento C). Com isso, obteve-se as imagens de AFM e fatores de rugosidade com estes três diferentes tratamentos.

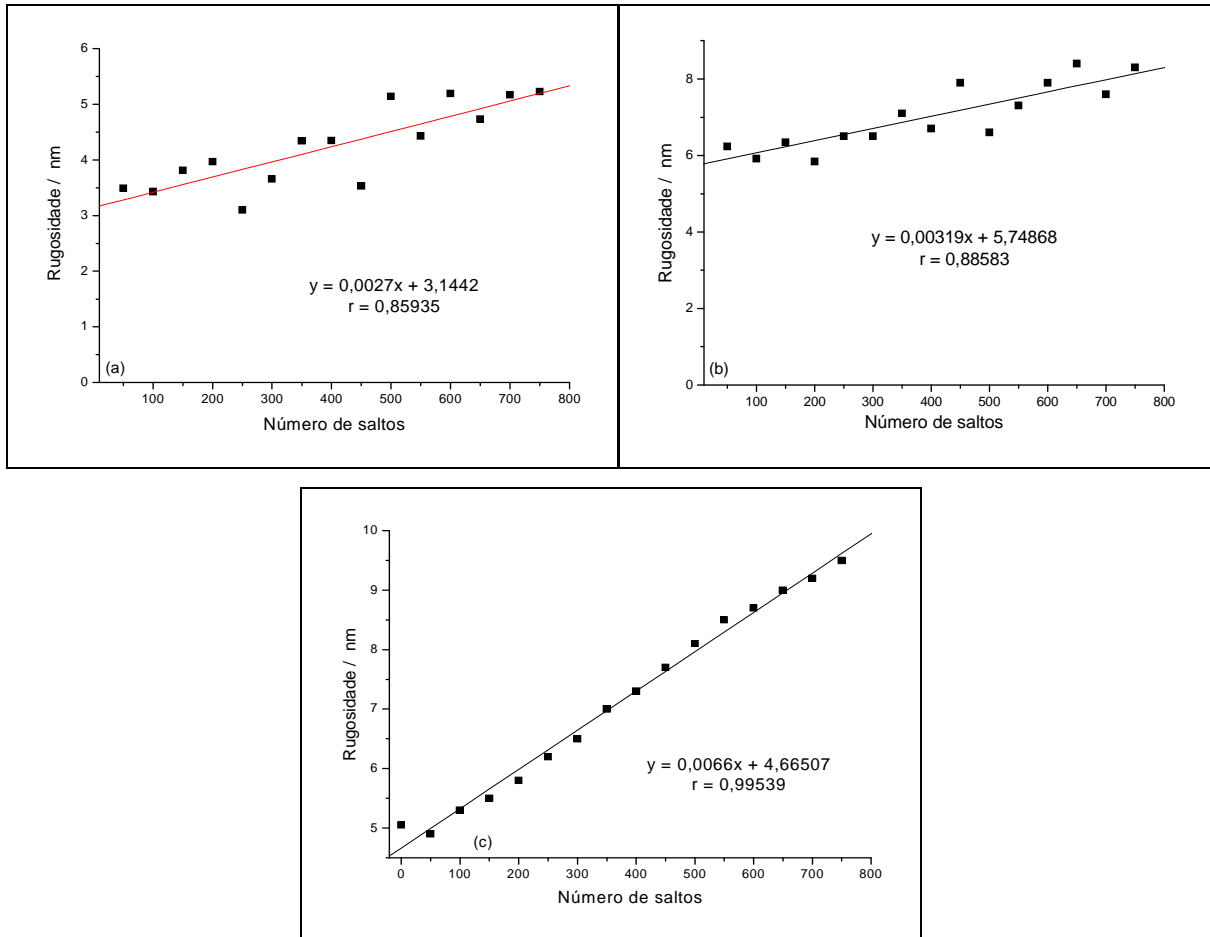
A figura 24 mostra as imagens de AFM de eletrodo de ouro policristalino após os diferentes experimentos com saltos de potenciais.



**Figura 24** – Imagens de AFM *in situ* de eletrodo de ouro policristalino após tratamentos A (a), B (b) e C (c). Condições dos saltos de potencial: potencial oxidativo = 0,6 V, potencial redutivo = -0,5 V, eletrólito = NaOH 0,5 M.

Como se pode observar na figura 25a, quando se manteve o eletrodo em potenciais positivo e negativo pelo mesmo tempo (1 s – tratamento A), os valores de rugosidade não aumentaram linearmente com o número de saltos e após 750 ciclos obteve-se fator de rugosidade de 5,1692 nm. Mantendo-se por mais tempo (3s) o potencial negativo (tratamento B) do que o potencial positivo (1 s) os valores de rugosidade também não aumentam linearmente com o número de saltos (figura 25 b) e obteve-se um fator de rugosidade de 8,1487 nm após 750 ciclos. Entretanto, quando se utilizou o tratamento C, mantendo-se o potencial positivo por maior tempo (3 s) do que o potencial negativo (1s) pode-se observar que a rugosidade aumenta linearmente com o número de saltos (figura 25 c) e obteve-se após 750 ciclos, maior fator de rugosidade do que os experimentos anteriores (9,6151 nm). Pode-se

observar também que há uma variação de 0,0027, 0,0032 e 0,0066 nm/salto para os experimentos A, B e C, respectivamente.



**Figura 25** – Dependência da rugosidade do eletrodo de ouro com o número de saltos. Condições de tempo para as aplicações de potências: (a) 1 s em potencial oxidativo e redutivo, (b) 1 s em potencial oxidativo e 3 s em potencial redutivo, (c) 3 s em potencial oxidativo e 1 s em potencial redutivo.

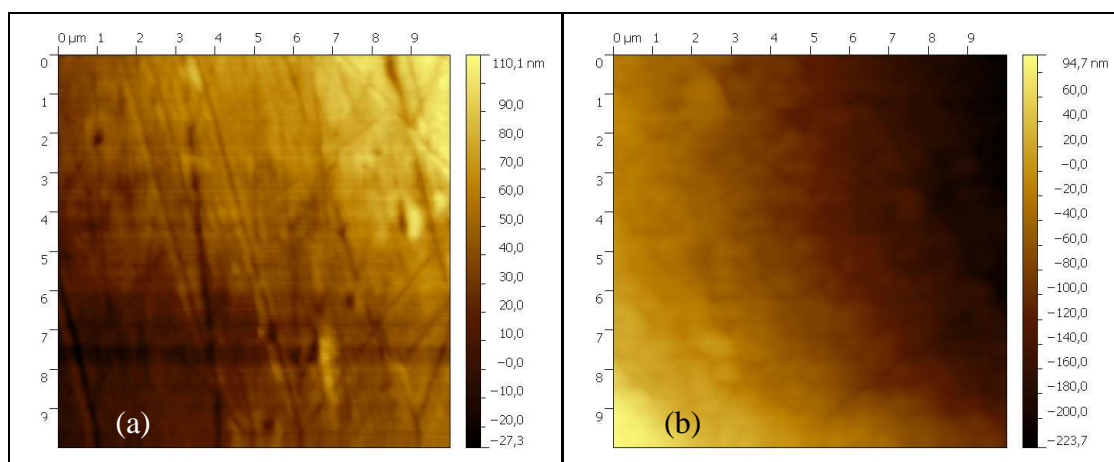
Com isso pode-se afirmar que o aumento da rugosidade observado da figura 23 tem maior dependência do potencial oxidativo do que do potencial redutivo aplicado, interferindo diretamente na morfologia do eletrodo.

### 5.1.3.2 Comportamento eletrocatalítico

#### 5.1.3.2.1 Influência *ex situ* da voltametria cíclica na morfologia de eletrodo de ouro policristalino em solução alcalina e na redução de oxigênio.

Medidas de redução de oxigênio foram realizadas em eletrodo de ouro policristalino antes e após o mesmo ter sido submetido a uma grande sequência de ciclos ( $E_{\text{inicial}} = -0,5 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{inversão}} = 0,7 \text{ mV}$ ,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ ) em meio alcalino. Imagens *ex situ* usando AFM também foram obtidas após estes dois momentos.

A figura 26 mostra imagens de AFM do eletrodo de ouro após polimento (a) e após ciclos (b) realizadas por voltametria cíclica em meio alcalino com velocidade de varredura de  $600 \text{ mV s}^{-1}$ .



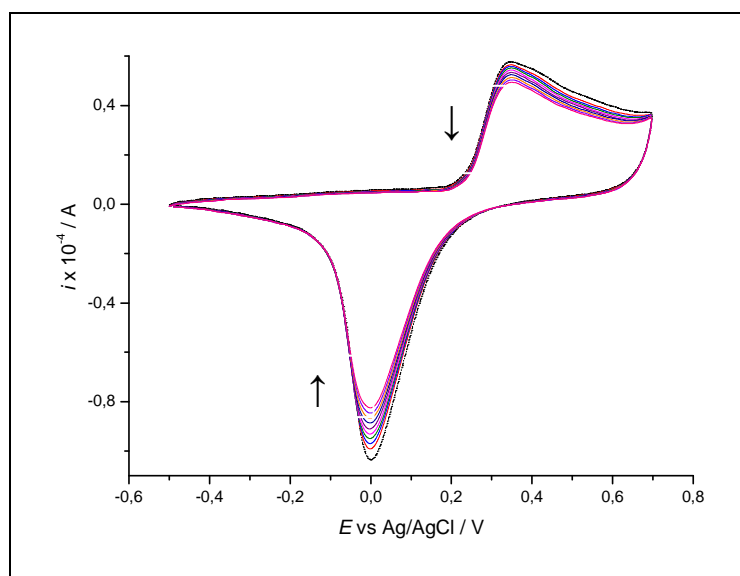
**Figura 26** – Imagens de AFM *ex situ* de eletrodo de ouro policristalino após polimento (a) e após ciclos em solução alcalina (b-1000 ciclos). Condições da voltametria cíclica: faixa de varredura =  $-0,5$  e  $0,7 \text{ V}$ ,  $v = 600 \text{ mV s}^{-1}$ , eletrólito =  $\text{NaOH } 0,5 \text{ M}$ .

Como pode se observar na figura 26, é notável a mudança da superfície do eletrodo. Em valores numéricos, obteve-se fator de rugosidade de  $20,92 \text{ nm}$  (figura 26a) e  $56,9 \text{ nm}$  (figura 26b) após polimento e após ciclos, respectivamente.

A medida eletroquímica da redução de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) foi realizada antes e após os ciclos do eletrodo para obter informações sobre a ativação do mesmo. Os potenciais de

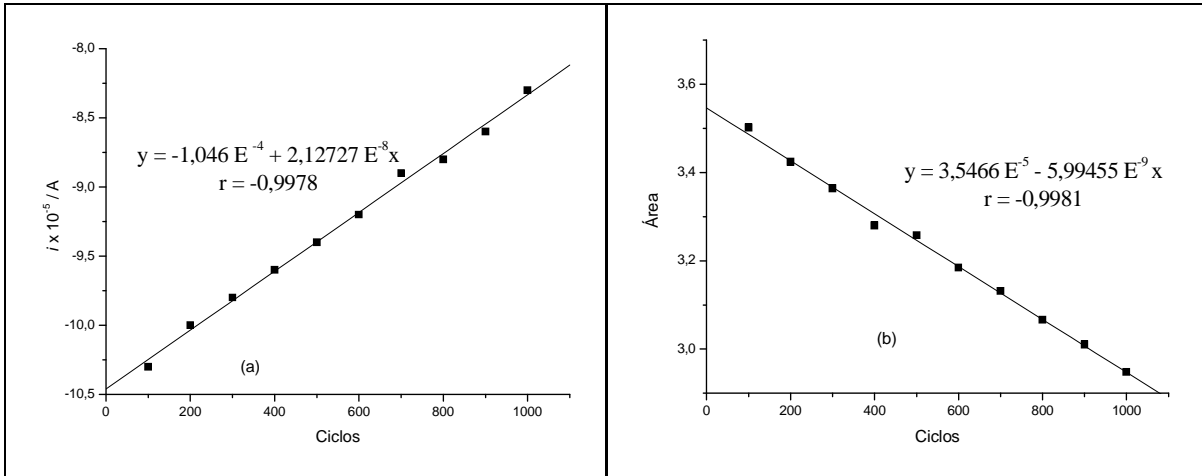
redução do  $O_2$  foram de  $-0,093$  e  $0,078$  V antes e após os ciclos respectivamente, mostrando assim a ativação da superfície do eletrodo de ouro.

Na figura 27 pode ser observado o voltamograma cíclico contendo os diferentes ciclos realizados para a obtenção da imagem de AFM da figura 26b.



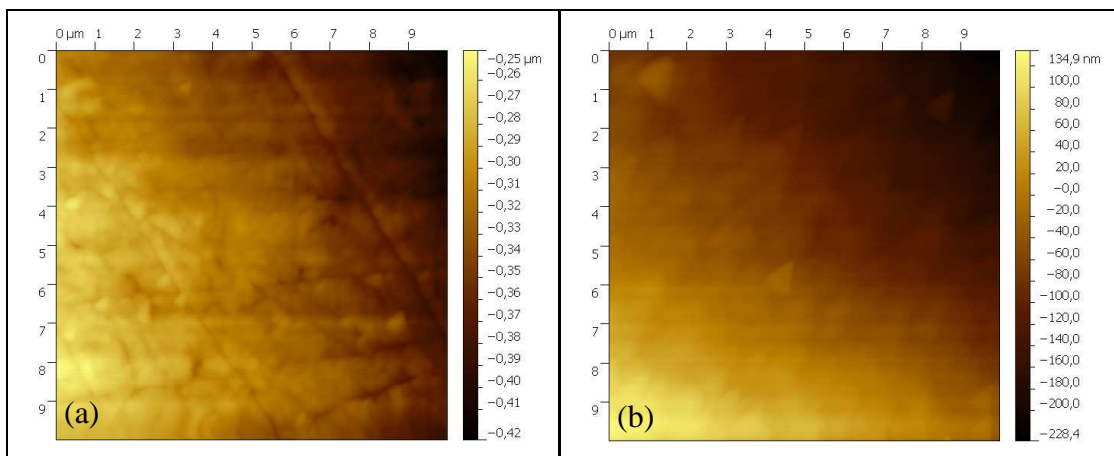
**Figura 27** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro em solução alcalina ( $NaOH$   $0,5$  mol  $L^{-1}$ ) com diferentes números de ciclos (..) 100 e (–) 200 a 1000 ciclos.  $E_{inicial}$ :  $-0,5$  V,  $E_{inversão}$ :  $0,7$  V,  $v = 600$  mV  $s^{-1}$ .

Como podem ser observados na figura 27 os valores de corrente dos picos de oxidação e redução do ouro diminui com o aumento do número de ciclos, mas a diminuição é maior para o pico de redução. Na figura 28a e b está retratada a relação para o pico da redução do ouro com: os valores de corrente versus ciclos e os valores de área de pico versus ciclos, respectivamente. Pode-se observar que ambos os casos apresentam relação linear.



**Figura 28** – Dependência dos números de ciclos versus os valores de corrente do pico (a) e área (b) da redução do ouro.

A figura 29 mostra imagens de AFM do eletrodo de ouro após polimento (a) e após ciclos (b) quando foi realizada voltametria cíclica em meio alcalino com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 29** – Imagens de AFM *ex situ* de eletrodo de ouro policristalino após polimento (a) e após ciclos em solução alcalina (b-1000 ciclos). Condições da voltametria cíclica: faixa de varredura = -0,5 e 0,7 V,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , eletrólito = NaOH 0,5 M.

Quando os ciclos foram realizados em  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , obteve-se fator de rugosidade de 29,92 nm (figura 29a) e 38,31 nm (figura 29b) após polimento e após ciclos, respectivamente. Pode-se observar que há um aumento da rugosidade após os ciclos, mas esse aumento é menor do que quando os ciclos foram realizados com velocidade de varredura mais rápida ( $600 \text{ mV s}^{-1}$  – figura 26).



Com a velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  o potencial de redução do oxigênio foi de  $-0,116$  e  $-0,009 \text{ V}$  antes e após os ciclos, respectivamente, mostrando também a ativação da superfície do eletrodo.

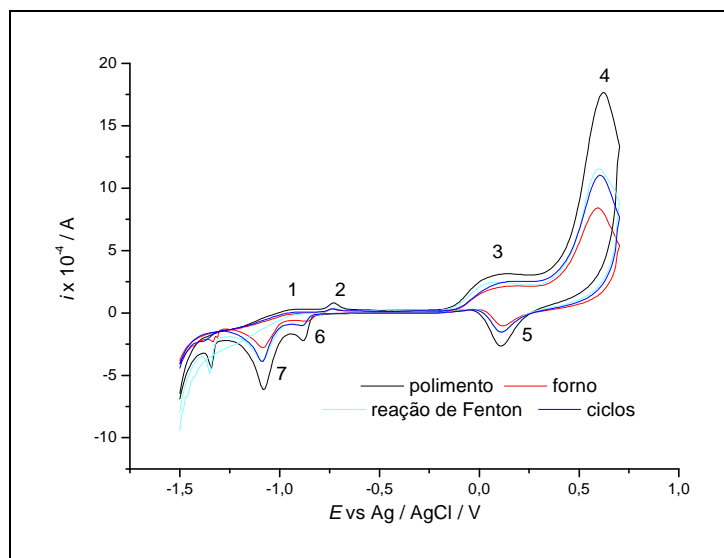
A diferença entre os valores de potencial da redução do oxigênio antes e após os ciclos foi de  $0,075$  e  $0,107 \text{ V}$  para  $600$  e  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , respectivamente. Com isso, pode-se inferir que em meio alcalino, os ciclos mais lentos tem maior influência na ativação dos sítios ativos do ouro policristalino do que ciclos mais rápidos, mas após ciclos mais rápidos os valores de rugosidade do eletrodo obtidos foram maiores, afetando diretamente na morfologia do eletrodo de ouro.

#### 5.1.3.2.2 Influência da ativação e desativação de ouro policristalino no perfil voltamétrico do etanotiol.

Sabendo-se que diferentes tipos de tratamento no eletrodo de ouro policristalino podem interferir na morfologia e na atividade do ouro, nesta parte do trabalho submeteu-se o eletrodo a diferentes tipos de tratamentos para ativar e desativar os sítios ativos do ouro. Após foi realizada a medida voltamétrica de etanotiol nestas superfícies, com o intuito de observar se a ativação ou desativação da superfície interfere no sistema do composto estudado (etanotiol).

É conhecido que tratamentos como polimento, ciclos e forno irão ativar a superfície do ouro e tratamento com reação de Fenton irá desativar a superfície.

Na figura 30 podem ser observadas as medidas voltamétricas cíclicas de etanotiol ( $5 \text{ mM}$ ) em solução alcalina, utilizando eletrodos policristalinos de ouro submetidos previamente aos quatro tipos de tratamentos citados anteriormente.



**Figura 30** – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de ouro policristalino em solução alcalina ( $\text{NaOH } 0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ) com etanotiol ( $C = 5 \text{ mM}$ ) em diferentes tipos de tratamento. Condições experimentais:  $E_{\text{inicial}}: -1.5 \text{ V}$ ,  $E_{\text{inversão}}: 0.7 \text{ V}$ ,  $\nu = 1200 \text{ mV s}^{-1}$ .

Na medida voltamétrica do etanotiol com o eletrodo de ouro após diferentes tipos de tratamentos, não se pode observar deslocamento de potencial para nenhum dos picos do sistema estudado e sendo assim, pode-se inferir que a ativação ou desativação do ouro não interfere nas reações entre eletrodo de ouro policristalino com etanotiol em solução alcalina. Nestes voltamogramas (figura 30), podem-se observar diferentes valores de correntes de pico obtidos para os diferentes tratamentos realizados. Isso se deve a menor ou maior imersão do eletrodo no eletrólito (quanto mais o eletrodo estiver imerso no eletrólito, maiores serão os valores de corrente de picos obtidos).

#### 5.1.3.2.3 Influência da voltametria cíclica em solução etanotiólica alcalina sobre o eletrodo de ouro policristalino e na redução de oxigênio.

Medidas de redução de  $\text{O}_2$  foram realizadas em eletrodo de ouro policristalino antes e após o mesmo ser submetido a 1000 ciclos ( $E_{\text{inicial}} = -1,5 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{inversão}} = 0,7 \text{ mV}$ ,  $\nu = 600 \text{ mV s}^{-1}$ ) em meio alcalino contendo etanotiol ( $6,44 \text{ mM}$ ) em solução.

O potencial de redução do oxigênio após o polimento do eletrodo foi de - 0,115 V. Após 100, 200 e 300 ciclos em solução etanotiólica alcalina os potenciais de redução do oxigênio foram de -0,371, -0,378 e -0,379 V, respectivamente. Não foram realizadas medidas da redução do O<sub>2</sub> com valores de ciclos maiores que 300, porque o potencial já atingiu valores muito negativos, podendo assim acarretar erros de medidas uma vez que em potenciais muito negativos inicia a evolução de hidrogênio. Entretanto, pode-se inferir que quando o eletrodo é submetido a ciclos em meio etanotiólico alcalino, há a desativação da superfície do ouro.

O mesmo experimento foi realizado em meio alcalino, sem a presença de etanotiol na solução. O potencial de redução do oxigênio após o polimento do eletrodo foi de - 0,118 V e após 100, 200, 300 e 1000 ciclos, os potenciais de redução do oxigênio foram de -0,026, -0,006, -0,006 e -0,006 V, respectivamente. Como pode ser observado, após os ciclos somente em solução alcalina, há a ativação da superfície do eletrodo, sendo que o maior aumento da ativação se dá após 100 ciclos, tornando-se constante após 200 ciclos.

Sendo assim, diferente do resultado da ativação do eletrodo em meio alcalino após os ciclos (ativação do ouro), quando os ciclos foram realizados em solução alcalina contendo etanotiol, ocorreu à desativação do eletrodo de ouro.

#### 5.1.4 Conclusões – Parte I

Como já abordado anteriormente, a maioria dos trabalhos presentes na literatura que relatam as interações entre tióis e eletrodo de ouro, dizem respeito à formação de monocamadas altamente organizadas e suas aplicações. Poucos são os trabalhos que relatam quais os processos eletroquímicos dizem respeito a interação entre tióis e ouro e estes estão detalhadamente descritos no item 3.1.2 e dizem respeito aos processos de adsorção e dessorção de tiol em ouro.

Como citado no item 3.1.3, o mecanismo reacional de compostos de enxofre como, por exemplo, etanotiol, tem sido exaustivamente estudado em eletrodo de mercúrio. Já o mecanismo eletroquímico destes compostos com eletrodo de ouro que estão descritos na literatura, exploram apenas uma faixa mais catódica de potencial.

Sendo assim, o presente trabalho descreveu o mecanismo eletroquímico do etanotiol que contempla toda a faixa útil de potenciais (-1,5 a +0,7 mV) do eletrodo de ouro em meio

alcalino. Esta faixa oferece importantes informações para a interpretação de mecanismo reacional em meio alcalino.

Além da completa descrição do mecanismo reacional de etanotiol com eletrodo de ouro em meio alcalino, com os experimentos realizados nesta parte do trabalho, também podemos concluir que:

- O ataque radical de espécies OH na superfície do eletrodo remove tiolato da superfície, mas também remove ouro em pequenas quantidades;
- A rugosidade da superfície do eletrodo tem maior dependência do potencial oxidativo do que o potencial redutivo aplicado, interferindo diretamente na morfologia do eletrodo;
- Os ciclos mais lentos realizados por voltametria cíclica, apresentaram maior influência na ativação dos sítios ativos do ouro policristalino do que em ciclos mais rápidos;
- Após ciclos mais rápidos os valores de rugosidade do eletrodo são maiores, afetando diretamente a morfologia da superfície do eletrodo de ouro;
- Diferentes tipos de tratamentos de ativação e desativação do eletrodo de ouro não interferem nas reações entre etanotiol e eletrodo de ouro em meio alcalino;
- Quando o eletrodo de ouro policristalino foi submetido a uma sequência de ciclos em meio etanotiólico, houve a desativação da superfície.

## **5.2 Parte II – Comportamento do etanotiol frente a sistemas redox em solução**

Através da determinação voltamétrica de etanotiol, sulfeto inorgânico e sulfito em vinho tinto, rose e branco, pode-se observar que estes compostos estão naturalmente presentes em algumas amostras e os resultados estão descritos no item 5.2.3. Levando-se em consideração que o vinho apresenta vários sistemas redox, e o etanotiol tem a capacidade de se oxidar ou se reduzir, faz-se necessário o estudo da influência do etanotiol na atividade antioxidante e no teor de fenóis totais da amostra. Este estudo complementa os resultados da Parte I do presente trabalho. Com isso, teremos tanto o estudo do mecanismo reacional do etanotiol em eletrodo polarizado (ouro) quanto seu comportamento em meio de um sistema redox em solução (vinho).

Em estudos prévios realizados por espectrofotometria, pode-se observar que o etanotiol, assim como os compostos fenólicos, age como antioxidante, uma vez que reagem com DPPH atenuando seu sinal.

Para estudar a influência do etanotiol na atividade antioxidante dos compostos naturalmente presentes no vinho, o ácido gálico e o resveratrol foram escolhidos como compostos antioxidantes de referência. Os resultados estão apresentados a seguir.

### 5.2.1 Influência do etanotiol na atividade antioxidante do resveratrol e do ácido gálico.

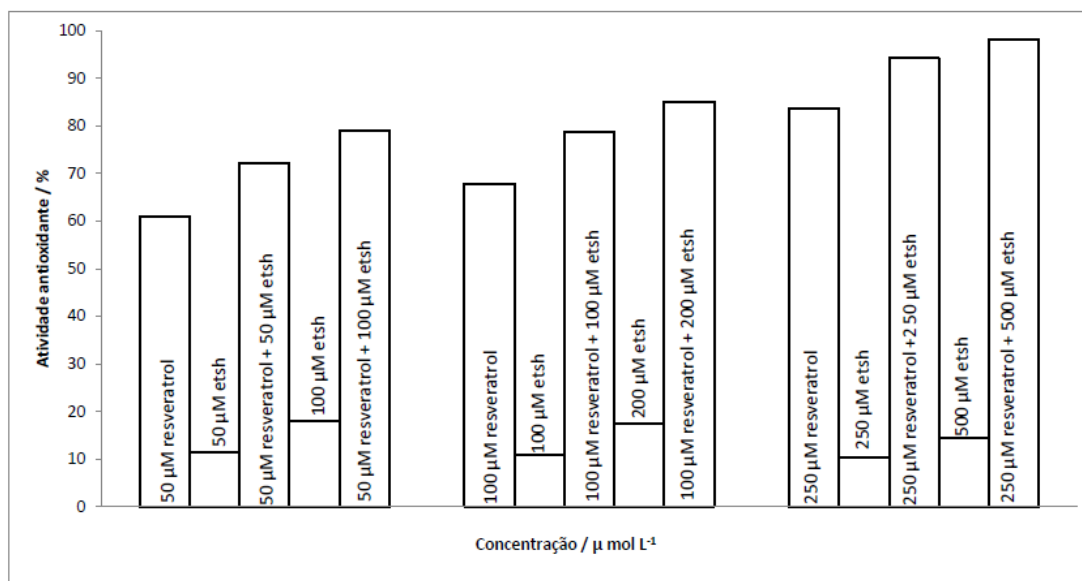
O resveratrol é o antioxidante mais estudado em vinhos. Sendo assim, estudos individuais da influência do etanotiol na atividade antioxidante do resveratrol foram realizados.

A atividade antioxidante do resveratrol nas concentrações 50, 100 e 250  $\mu\text{M}$ , apresentou os valores de 60,95; 67,80 e 83,72%, respectivamente.

Foram adicionadas ao resveratrol, duas concentrações diferentes de etanotiol, equivalentes a mesma concentração molar do resveratrol e o dobro dela.

Para a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de resveratrol, adicionou-se etanotiol para perfazer concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ . Similarmente, para a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol, adicionou-se etanotiol perfazendo as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$ . Para a concentração de 250  $\mu\text{M}$  de resveratrol, as concentrações de etanotiol ficaram em 250 e 500  $\mu\text{M}$ .

A figura 31 mostra a variação nos valores de atividade antioxidante do resveratrol, do etanotiol e das misturas de resveratrol com etanotiol nas diferentes concentrações.



**Figura 31** – Valores de atividade antioxidante do resveratrol, etanotiol e resveratrol + etanotiol

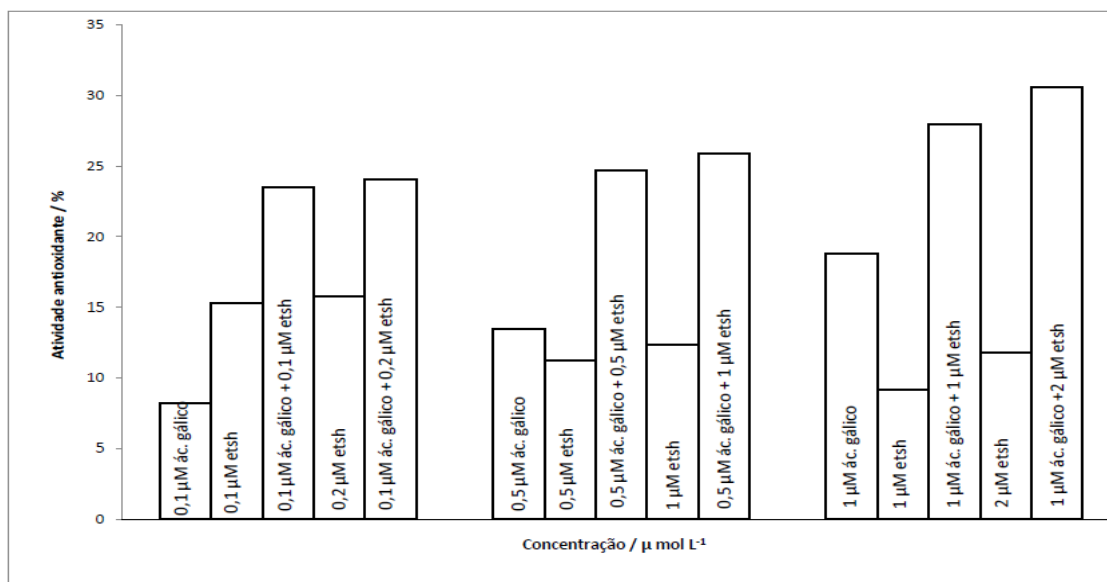
Quando se adicionou etanotiol à solução de 50  $\mu\text{M}$  resveratrol perfazendo concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , os valores de atividade obtidos foram de 72, 27 e 78,59%, respectivamente. Em adições subsequentes de etanotiol à solução de 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol, perfazendo as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$ , obteve-se 80,01 e 85,12% de atividade, respectivamente. Para a solução de 250  $\mu\text{M}$  de resveratrol, as atividades ficaram em 94,06% e 98,12% na presença de concentração de etanotiol de 250 e 500  $\mu\text{M}$ . Com estes resultados, pode-se observar que o etanotiol apresenta o comportamento de um antioxidante quando reage com o DPPH. Sendo assim, verifica-se que quando etanotiol é adicionado a uma solução de resveratrol com atividade antioxidante conhecida, o valor de atividade da mistura é o resultado do somatório da atividade do etanotiol e do resveratrol, não ficando, portanto evidenciada uma relação de sinergismo entre as duas espécies.

O mesmo estudo foi realizado com ácido gálico, entretanto, diferentes concentrações do antioxidante (em relação ao resveratrol) foram utilizadas e conseqüentemente, diferentes valores de atividade antioxidante foram obtidos (Figura 32). A atividade antioxidante do ácido gálico nas concentrações 0,1; 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , apresentou os valores de 8,12; 14,73 e 18,21%, respectivamente.

Foram adicionadas ao ácido gálico, duas concentrações diferentes de etanotiol, equivalentes a mesma concentração molar do ácido gálico e o dobro dela. Para a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  de ácido gálico, adicionou-se etanotiol para perfazer concentrações de 0,1 e 0,2  $\mu\text{M}$ . Similarmente, para a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de ácido gálico, adicionou-se etanotiol

perfazendo as concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ . Para a concentração de 1  $\mu\text{M}$  de ácido gálico, as concentrações de etanotiol ficaram em 1 e 2  $\mu\text{M}$ .

A figura 32 mostra a variação nos valores de atividade antioxidante do ácido gálico, do etanotiol e das misturas de ácido gálico com etanotiol nas diferentes concentrações.



**Figura 32** – Valores de atividade antioxidante do ácido gálico, etanotiol e ácido gálico + etanotiol

De acordo com a figura 32, observa-se que o ácido gálico apresentou comportamento similar ao do resveratrol na presença de etanotiol. Contudo, os valores de atividade antioxidante foram menores uma vez que as concentrações molares utilizadas do antioxidante (em relação às concentrações do resveratrol estudadas) foram também menores. Sendo assim, pode-se inferir que similarmente ao resveratrol, não se observa para o ácido gálico um efeito sinérgico na presença de etanotiol.

Amostras reais de vinhos contêm na verdade um conjunto grande de espécies que podem atuar como antioxidantes. Desta forma é necessário avaliar a ação do etanotiol como antioxidante nessas matrizes.

### 5.2.2 Influência do tempo de exposição do etanotiol na atividade antioxidante e na concentração de fenóis em vinhos

Para estudar o comportamento do etanotiol nas amostras de vinhos, estas foram fortificadas com o composto sulfurado e mantidas em contato durante diferentes tempos de exposição. As amostras foram armazenadas em frascos âmbar, protegidos da luz, hermeticamente fechados e mantidos a temperatura ambiente de 25 °C. A concentração de etanotiol adicionado às amostras foi de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo este superior aos valores quantificados em amostras de vinhos relatados pela literatura.

Foram realizadas análises da atividade antioxidante e da concentração de fenóis totais nas amostras fortificadas e nas amostras controle (sem fortificação) nos tempos: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 dias. O intuito desse estudo foi observar como a atividade antioxidante e a concentração de fenóis irá se comportar na presença de etanotiol ao longo do tempo.

As amostras controle mantiveram os mesmos valores de atividade antioxidante até o final dos tempos estudados (60 dias). Da mesma forma, os valores de concentração de fenóis totais mantiveram-se constantes. Os valores de atividade antioxidante e concentração de fenóis totais nas amostras de vinhos controle estão descritos na Tabela 1.



**Tabela 1** – Valores de atividade antioxidante e concentração de fenóis totais nas amostras de vinhos controle.

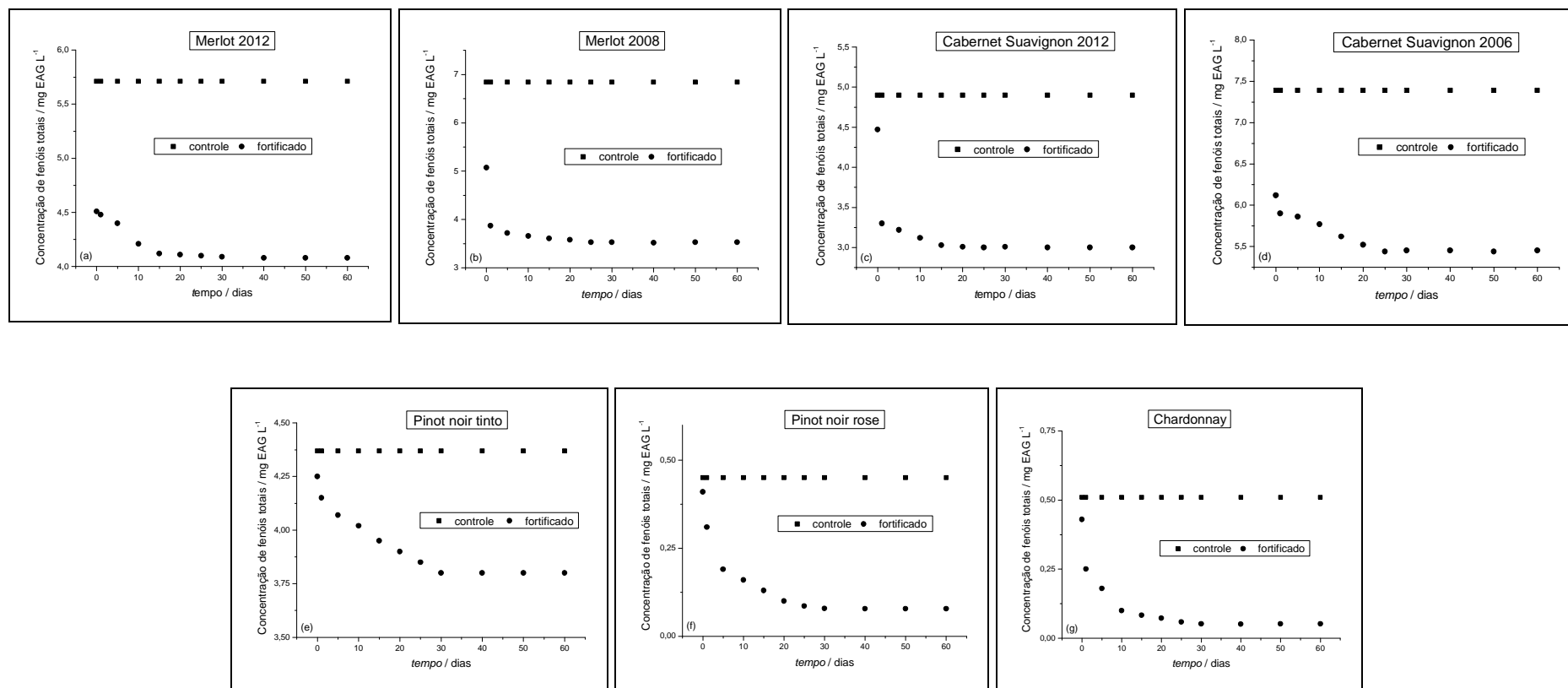
Amostras	Atividade antioxidante (%)	Concentração de fenóis totais (mg L <sup>-1</sup> )
Cabernet Sauvignon 2012 (tinto)	92	4,90
Cabernet Sauvignon 2006 (tinto)	98	7,39
Merlot 2012 (tinto)	94	5,71
Merlot 2008 (tinto)	96	6,84
Pinot noir tinto	92	4,37
Pinot noir rose	70	0,41
Chardonnay (branco)	81	0,51

Como pode ser observado na tabela 1, as amostras de vinhos tintos controle, apresentaram valores de atividade antioxidantes entre 92 e 96 %. Já as amostras de vinho rose e branco apresentaram atividade antioxidante de 70 e 81%, respectivamente. Os valores de concentração de fenóis totais para os vinhos tintos foram de 4,37 a 7,39 mg L<sup>-1</sup>. Os vinhos rose e branco apresentaram valores de concentração de fenóis totais de 0,41 e 0,51, respectivamente.

Todas as amostras fortificadas de vinho tinto (Cabernet Sauvignon 2012 e 2006, Merlot 2012 e 2008 e Pinot noir), mantiveram os mesmos valores de atividade antioxidante que suas respectivas amostras controle, durante os diferentes em que as mesmas permaneceram fortificadas com etanotiol. Pode-se então afirmar que o etanotiol não influenciou no valor da atividade antioxidante medido nas amostras. Isso indica que a concentração de etanotiol adicionada ao meio não foi suficiente para alterar a atividade antioxidante das amostras, uma vez que o vinho tinto apresenta alto teor de fenóis totais (4,37 a 7,39 mg L<sup>-1</sup>). Adicionalmente, deve-se considerar o modo como o poder antioxidante foi calculado. Na prática, o poder antioxidante é medido indiretamente através das alterações do sinal do DPPH. Sendo esta medida não específica, ela pode representar todo o conjunto das espécies que contribuem para um valor de atividade antioxidante.

Já as amostras de vinho rose (Pinot noir) e branco (Chardonnay) apresentaram uma redução de 10% nos valores de atividade no decorrer dos 60 dias em que as amostras permaneceram expostas ao etanotiol. Neste caso, a ação do etanotiol como oxidante pode ser observada, porque estas amostras apresentaram concentração de fenóis totais menores (0,41 e 0,51 mg L<sup>-1</sup>) que nas amostras de vinho tinto.

Em termos práticos, o teor de fenóis totais em vinhos está relacionado à capacidade antioxidante medida. Contudo, observou-se neste trabalho (figura 33), que para os vinhos tintos, o teor de fenóis totais diminui com a presença de etanotiol ao longo do tempo, embora a atividade antioxidante não tenha se alterado. Para os vinhos brancos, observou-se uma diminuição tanto na concentração de fenóis totais quanto na atividade antioxidante em função da presença do etanotiol ao longo do tempo.



**Figura 33** – Gráficos de decaimento de valores de concentração de fenóis totais em amostras de vinho com diferentes tempos de exposição ao etanol (fortificadas) e controle (sem fortificação). (a) Merlot 2012, (b) Merlot 2008, (c) Cabernet Sauvignon 2012, (d) Cabernet Sauvignon 2006, (e) Pinot noir tinto, (f) Pinot noir rose e (g) Chardonnay.

Este resultado aparentemente contraditório em relação às interações individuais entre etanotiol e ácido gálico e etanotiol e resveratrol, pode ser explicado pela complexidade das amostras reais. Nas amostras de vinhos tintos, pode existir a ação de outros antioxidantes que não pertencem à classe dos fenóis e, portanto não interagem com o reagente de Folin utilizado para a determinação da concentração de fenóis totais nas amostras, porém apresentam atividade antioxidante. Assim como para os fenóis, pode-se inferir que este comportamento não ocorre nos vinhos menos pigmentados (branco e rose).

### 5.2.3 Determinação voltamétrica de etanotiol em vinhos

A determinação dos compostos de interesse utilizando-se eletrodo de ouro e meio alcalino não foi possível, pois etanotiol e sulfito apresentam picos de redução com o mesmo potencial. Essa sobreposição dos sinais acarreta uma equivocada quantificação analítica dos compostos nas amostras de vinho.

Sendo assim, as concentrações de etanotiol (representando tióis de baixo peso molecular), sulfeto inorgânico e sulfito, foram determinadas diretamente por voltametria de redissolução catódica, utilizando-se eletrodo de mercúrio de gota pendente. Para a realização dos ensaios, utilizou-se 1 mL de cada amostra de vinho tinto (Cabernet Sauvignon safras 2012 e 2006, Merlot safras 2012 e 2008, Pinot noir safra 2012), rose (Pinot noir safra 2012) e branco (Chardonnay safra 2011). Foram testados diferentes volumes de amostra (0,5 e 1,5 mL), mas a adição de 1 mL na célula voltamétrica apresentou melhores resultados. Utilizando 1,5 mL de amostra, as adições do padrão não apresentaram relação linear com os valores de corrente obtidos, devido ao efeito da matriz. A adição de 0,5 mL de amostra impossibilita a detecção de alguns compostos em algumas amostras, por ser um pequeno volume de amostra.

É válido salientar que tióis de baixo peso molecular, tais como metanotiol, etanotiol e propanotiol, apresentam o mesmo potencial de pico quando redissolvidos catodicamente em eletrodo de mercúrio utilizando eletrólito com pH ácido (DIAS et al., 2010). Sendo assim, quando se trata de determinação voltamétrica de etanotiol nas amostras deste trabalho, ele está representando os tióis de baixo peso molecular.

Na Tabela 2, podem ser visualizados os valores de concentrações calculados nas amostras de vinhos pesquisadas neste trabalho.

**Tabela 2** – Valores de concentração de etanotiol, sulfeto inorgânico e sulfito em amostras de vinhos.

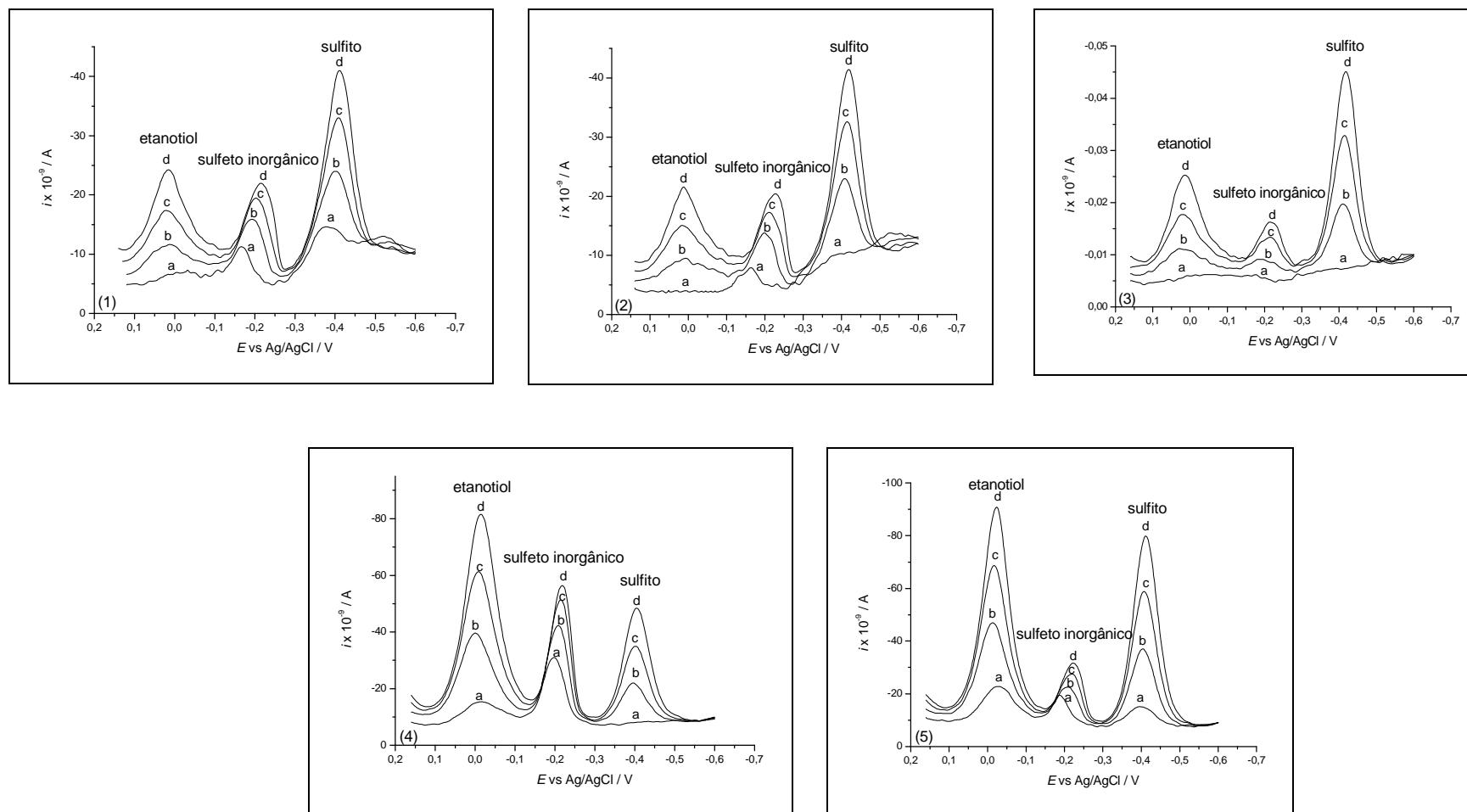
Amostras	Etanotiol	Sulfeto inorgânico	Sulfito
	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\text{mg L}^{-1}$ )
Cabernet Sauvignon 2012 (tinto)	4,92	4,77	0,104
Cabernet Sauvignon 2006 (tinto)	n.d.	n.d.	n.d.
Merlot 2012 (tinto)	n.d.	2,16	0,038
Merlot 2008 (tinto)	n.d.	n.d.	0,027
Pinot noir tinto	n.d.	n.d.	n.d.
Pinot noir rose	6,15	4,24	n.d.
Chardonnay (branco)	11,82	4,30	0,056

Todas as amostras estão dentro dos valores estabelecidos pela legislação brasileira para o teor de sulfito em vinho ( $0,035 \text{ g}/100 \text{ mL}$  ou  $350 \text{ mg L}^{-1}$ ). O sulfito foi quantificado nas amostras de Cabernet Sauvignon 2012 ( $0,104 \text{ mg L}^{-1}$ ), Merlot 2012 e 2008 ( $0,038$  e  $0,027 \text{ mg L}^{-1}$ ) e Chardonnay ( $0,056 \text{ mg L}^{-1}$ ). Pode-se observar nas amostras do mesmo tipo de vinho, mas de diferentes safras, que o teor de sulfito é menor ou não detectável nas amostras mais antigas. O decréscimo pode ter relação com o tempo de armazenamento das amostras, uma vez que o sulfito pode continuar reagindo com os compostos que fazem parte da matriz, sendo consumido ao longo do tempo.

Não há valores estabelecidos na legislação brasileira, para teores de etanotiol e de sulfeto inorgânico, mas mesmo assim é válido discutir sobre os valores determinados nas amostras, já que estes compostos tem relação direta com a qualidade final do produto. O vinho que apresentou maior teor de etanotiol foi o Chardonnay ( $11,82 \mu\text{g L}^{-1}$ ), mas o composto também foi quantificado em amostras do tipo Cabernet Sauvignon 2012

(4,92  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e Pinot noir rose (6,15  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Já o sulfeto inorgânico está presente nas amostras de Cabernet Sauvignon 2012 (4,77  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), Merlot 2012 (2,16  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), Pinot noir rose (4,24  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e Chardonnay (4,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). No caso do sulfeto de inorgânico, também se pode observar a presença do composto em amostras com fabricação mais recente. Como já dito anteriormente, o teor de compostos sulfurados pode variar de acordo com a estirpe da levedura utilizada, com a composição do mosto, fatores climáticos e práticas agronômicas (GREEN et al., 2011) e isto pode mais uma vez ser confirmado, já que o teor dos compostos encontrados nestes vinhos, cujas uvas foram cultivadas no Brasil, são diferentes dos valores dos mesmos cultivares de outros países (RAUHUT et al., 1998; MESTRES et al., 1999; FANG e QIAN, 2005; LOPÉZ et al., 2007; SIEBERT et al., 2010; UGLIANO et al., 2010).

A Figura 34 mostra os voltamogramas obtidos das amostras de vinho Cabernet Sauvignon 2012 (a), Merlot 2012 (b), Pinot noir tinto (c), Pinot noir rose (d) e Chardonnay (e). Além das determinações analíticas nas amostras, também foram realizadas fortificações nas mesmas, seguidas dos testes de recuperação dos analitos (Tabela 3).



**Figura 34** – Voltamogramas de redissolução catódica das amostras de vinho Caberbet Sauvignon 2012 (1), Merlot 2012 (2), Pinot noir tinto (3), Pinot noir rose (4) e Chardonnay (5). Condições experimentais:  $E_{pt}$ : 120 mV,  $t_{pt}$ : 30 s,  $E_{inicial}$ : 150 mV,  $E_{final}$ : - 600 mV,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Concentrações das adições do padrão: Etanotiol: (a) amostra, (b) 200, (c) 400, (d) 600  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Sulfeto inorgânico: (a) amostra, (b) 16, (c) 32, (d) 48  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Sulfito: (a) amostra, (b) 1,5, (c) 3, (d) 4,5  $\text{mg L}^{-1}$

**Tabela 3** – Recuperações dos analitos em amostras de vinhos

Amostras	Etanotiol		Sulfeto inorgânico		Sulfito	
	Fortificado	Recuperado	Fortificado	Recuperado	Fortificado	Recuperado
	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	(%)	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	(%)	( $\text{mg L}^{-1}$ )	(%)
Cabernet Sauvignon 2012 (tinto)	200	78,62	16	118,00	1,5	112,34
Cabernet Sauvignon 2006 (tinto)	200	81,00	16	112,36	1,5	96,00
Merlot 2012 (tinto)	200	76,12	16	113,12	1,5	111,87
Merlot 2008 (tinto)	200	78,45	16	116,43	1,5	119,00
Pinot noir tinto	200	87,32	16	94,56	1,5	114,45
Pinot noir rose	100	111,54	8	115,00	0,75	116,20
Chardonnay (branco)	100	105,11	8	81,25	0,75	115,45



Os valores de recuperação ficaram entre 76 a 112% para etanotiol, 81 a 118% para sulfeto inorgânico e 96 a 119% para sulfito. Estes valores podem ser considerados satisfatórios uma vez que se trata de uma matriz altamente complexa (RIBANI et al., 2004; CAMILO et al., 2008).

As amostras de vinho apresentam um forte efeito de matriz para as medidas voltamétricas. Contudo, devido à alta sensibilidade das medidas em relação aos analitos, pode-se trabalhar com fatores de diluição que permitem as determinações pelo método da adição do padrão dentro das faixas encontradas para esses analitos em vinhos.

#### 5.2.4 Conclusões – Parte II

Com os experimentos realizados nesta parte do trabalho, podemos concluir que:

- Quando etanotiol é adicionado em uma solução de resveratrol com atividade antioxidante conhecida, o valor de atividade da mistura aumenta. Isso ocorre porque o etanotiol também se comporta como um antioxidante, havendo assim o somatório da atividade do etanotiol com a atividade do resveratrol;

- Quando o etanotiol é adicionado a uma solução de ácido gálico com atividade antioxidante conhecida, há também o somatório da atividade do etanotiol com a atividade do ácido gálico;

- Em vinhos tintos não se observou a diminuição da atividade antioxidante como função da diminuição da concentração total de fenóis, ocasionada pela ação do etanotiol ao longo do tempo;

- Em vinhos branco e rose observou-se a diminuição da atividade antioxidante como função da concentração total de fenóis, ocasionada pela ação do etanotiol ao longo do tempo;

- A atividade antioxidante e o teor de fenóis totais mantiveram-se constantes em todas as amostras controle armazenadas durante os 60 dias;

- Os valores de atividade antioxidante das amostras de vinho tinto fortificadas com etanotiol, mantiveram-se constantes durante os 60 dias de exposição;

- Os valores de atividade antioxidante das amostras fortificadas de vinho *rose* e branco, mantidas por 60 dias expostas a etanotiol, diminuíram com o tempo;

- As concentrações de fenóis diminuíram em todas as amostras fortificadas, sendo que permaneceram constantes após 25 dias de exposição ao etanotiol no caso das amostras de vinho tinto e após 30 dias no caso das amostras rose e branco;

- Utilizando o método voltamétrico em meio ácido foi possível determinar simultaneamente etanotiol (representando os tióis de baixo peso molecular), sulfeto inorgânico e sulfito;

- Das amostras analisadas, nenhuma apresentou teor de sulfito maior que o valor permitido pela legislação brasileira;

- Os valores de recuperação das amostras fortificadas são satisfatórios uma vez que se trata de uma matriz altamente complexa;

- Os valores de recuperação mostram também a alta sensibilidade do método, uma vez que o ensaio foi realizado com as amostras diluídas (10 vezes) e mesmo assim foi possível obter resultados satisfatórios.

## 6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A eletroquímica fornece informações de processos redox em eletrodos polarizados e em solução, podendo auxiliar também na determinação analítica de compostos que se oxidam ou se reduzem.

A proposta desse trabalho foi investigar a ação de uma espécie que se forma espontaneamente nos vinhos (etanotiol) com processos redox que caracterizam o poder antioxidante desta bebida. Para tanto, investigamos a capacidade do etanotiol em se reduzir ou se oxidar na superfície de um eletrodo polarizado e o seu comportamento num sistema redox em solução (sem polarização por eletrodo).

Em eletrodo polarizado, pode-se observar que o etanotiol apresenta-se nas formas oxidada e reduzida, podendo, portanto, mostrar em solução capacidade antioxidante ou oxidante.

De fato, este comportamento pode ser observado em parte nas amostras reais. Em vinhos tintos a atividade antioxidante manteve-se constante ao longo do tempo na presença de etanotiol indicando que outras espécies seriam responsáveis pela manutenção da atividade. Em vinhos branco e rose, o etanotiol foi responsável pela diminuição da atividade antioxidante. Este comportamento relaciona-se a uma maior ou menor ação de etanotiol como oxidante na solução. Contudo, frente a antioxidantes isolados (resveratrol e ácido gálico) o etanotiol agiu como um antioxidante. Este comportamento antagônico pode ser justificado pela capacidade do etanotiol apresentar-se nas formas reduzida e oxidada (conforme comprovado na primeira parte do trabalho) e pela complexidade das amostras reais investigadas, onde existem diversos pares redox que podem favorecer a oxidação ou a redução do etanotiol.

Este trabalho pode contribuir no sentido de avançar um pouco no entendimento dos processos redox, embora a matriz escolhida exija estudos complementares com oxidantes normalmente presentes, para que se possa compreender e prever a ação do etanotiol nos vinhos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGA. Disponível em: <<http://revistaadega.uol.com.br/Edicoes/42/artigo132576-2.asp>>  
Acesso em: 05 jul.de 2010.

ADEGA. Disponível em: <<http://revistaadega.uol.com.br/Edicoes/14/artigo36206-3.asp>>  
Acesso em: 3 jul. de 2012.

ALHAMA, J.; ROMERO-RUIZ, A.; LÓPEZ-BAREA, J. Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. **Journal of Chromatography A**. v. 1107, p. 52-58, 2006.

BAIN, C. D.; BIEBUYCK, H. A.; WHITESIDES, G. M. Comparison of Self -Assembled Monolayers on Gold: Coadsorption of Thiols and Disulfides. **Langmuir**, 5, p. 723-727, 1989.

BAKKER, J.; PRESTON, N. W.; TIMBERLAKE, CF. The determination of anthocyanins in ageing red wine: Comparison of HPLC and Spectral methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.37, n. 1, p.121-126, 1986.

BARNABÉ, D. Produção de vinho de uvas dos cultivares Niágara rosada e brodô: análises físico-químicas, sensorial e recuperação de etanol a partir do bagaço, Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicias livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p. 123-130, 1999.

BOUCHILLOUX, P., DARRIET, F.; HENRY, H.; LAVIGNE-CRUÈGE, V.; DUBOURDIEU, D. Identification Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3095-3099, 1998.

BRAJKOVICH, M.; TIBBITS, N.; PERON, G.; LUND, C. M.; DYKES, S. I.; KILMARTIN, P. A.; NICOLAU, L. Effect of Screwcap and Cork Closures on SO<sub>2</sub> Levels and Aromas in a Sauvignon Blanc Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 10006-10011, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRONNER, W. E.; BEECHER, G. R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. **Journal of Chromatography A**, v. 705, p. 247-256, 1995.

BUCKLEY, A.N.; HAMILTON, L.C.; WOODS, R. An investigation of sulphur (-II)/sulphur (0) system on gold electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemical**, v. 216, p. 213-227, 1987.

BÜTTNER, M.; KRÖGER, H.; GERHARDS, I.; MATHYS, D.; OELHAFEN, P. Changes in the electronic structure of gold particles upon thiol adsorption as a function of the mean particle size. **Thin Solid Films**, n. 495, p. 180-185, 2006.

CAMILO, F.C.; RODRIGUES, P.O.; WAGNER, T.M. Validação de um método analítico para análise simultânea de estavudina (D4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) em matéria-prima. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p. 22-29, 2008.

CAPONE, D.L.; SEFTON, M.A.; JEFFERY, D.W. Application of a Modified Method for 3-Mercaptohexan-1-ol. Determination to Investigate the Relationship between Free Thiol and Related Conjugates in Grape Juice and Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 4649–4658, 2011.

CARDWELL, T.J.; CHRISTOPHERSEN, J. Determination of sulfur dioxide and ascorbic acid in beverages using a dual channel flow injection electrochemical detection system. **Analytica Chimica Acta**, v. 416, n.13, p. 105-110, 2000.

CARUSO, A.N.; WANG, L.G.; JASWAL, S.S.; TSYMBAL, E.Y.; DOWBEN, P.A. The interface electronic structure of thiol terminate molecules on cobalt and gold surfaces. **Journal of Materials Science**, v. 41, p. 6198-6206, 2006.

CASELLA, I.G.; CONTURSI, M.; DESIMONI, E. Amperometric detection of sulfur-containing compounds in alkaline media. **Analyst**, n.127, p. 647-65, 2002.

COHEN, S.H., Lightbody. Atomic Force Microscopy/Scanning Tunneling Microscopy, 3. Ed., New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, Kluwer Academic Publishers, p. 210, 2002.

COHEN-ATIYA, M.; NELSON, A.; MANDLER, D. Characterization of *n*-alkanethiol self-assembled monolayers on mercury by impedance spectroscopy and potentiometric measurements. **Jornal of Electroanalytical Chemistry**, v. 593, p. 227-240, 2006.

CORDENTE, A.G., HEINRICH, A., PRETORIUS, I.S., SWIEGERS, J.H. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. **Yeast Research**, v.9, p.446-459, 2009.

CORTES, E.; RUBERT, A. A.; BENITEZ, G.; CARRO, P.; VELA, M. E.; SALVAREZZA, R. C. Enhanced Stability of Thiolate Self-Assembled Monolayers (SAMs) on Nanostructured Gold Substrates. **Langmuir**, n. 25, v.10, p. 5661-5666, 2009.

DIAS, D.; NASCIMENTO, P.C.; JOST, C. L.; BOHRER, D.; CARVALHO, L. M.; KOSCHINSKY, A. Voltammetric Determination of Low-Molecular-Weight Sulfur Compounds in Hydrothermal Vent Fluids – Studies with Hydrogen Sulfide, Methanethiol, Ethanethiol and Propanethiol. **Electroanalysis**, v.22, n.10, p. 1066-1071, 2010.

ENSAFI, A. A.; SOLEYMANI, H.A.; MIRMOMTAZ, E. Determination of sulfur contents of  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  and  $\text{S}^{2-}$  based on the electrocatalytic interaction with homogeneous mediator tris(2,2'-bipyridyl)Ru (II). **Microchemical Journal**, v. 89, n. 2, p. 108-115, 2008.

ESCHENBRUCH, R. Sulfite and sulfide formation during winemaking A Review. **American Journal of Enology Viticulture**, v.25, n.3, p.157-161, 1974.

ESCUADERO, A.; GOGORZA, B.; MELUÄ S, M. A. ; ORTIÄN, N.; CACHO, O.J.; FERREIRA, V. Characterization of the Aroma of a Wine from Maccabeo. Key Role Played by Compounds with Low Odor Activity Values. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3516-3524, 2004.

EVANS, S., ULMAN, A. Surface potential studies of alkyl-thiol monolayers adsorbed on gold. **Chemical Physical Letters**, n. 170, 462-466, 1990.

FANG, F., LI, J.M., ZHANG, P., TANG, K., WANG, W., PAN, Q.H., HUANG, W.D. Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. **Food Research International**, n. 41, v. 1, p. 53-60, 2008.

FANG, Y.; QIAN, M. C. Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. **Journal of Chromatography A**, v. 1080, p.177–185, 2005.

FEDRIZZI, B.; VERSINI, G.; LAVAGNINI, I.; NICOLINI, G.; MAGNO, F. Gas chromatography–mass spectrometry determination of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine A comparison of headspace solid phase microextraction and solid phase extraction methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 291-297, 2007.

FERREIRA, V.; ORTÍN, N.; CACHO, J. C. Optimization of a procedure for the selective isolation of some powerful aroma thiols. Development and validation of a quantitative method for their determination in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 190–198, 2007.

FLAMINI, R. Mass Spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, p.218-250, 2003.

GALLICE, W.C.; MESSERSCHMIDT, I.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização espectroscópica multivarida do potencial antioxidante de vinhos. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 397-403, 2011.

GARCÍA, A. A.; GRANDE, B. C.; GÁNDARA, J. S. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p.175-180, 2004.

GHANNAM, S.M. Differential electrolytic potentiometric determination of some thiol compounds in their dosage forms. **Il Farmaco**, v. 59, p. 331-334, 2004.

GREEN, J. A.; PARR, W.V.; BREITMEYER, J.; VALENTIN, D.; SHERLOCK, R. Sensory and chemical characterisation of Sauvignon blanc wine: Influence of source of origin. **Food Research International**, v. 44, p. 2788–2797, 2011.

HALLINAN, C. P.; SAUL, D. J.; JIRANEK, V. Differential utilizations of sulfur compounds for H<sub>2</sub>S liberation by nitrogen-starved wine yeasts. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 5, p.82-90, 1999.

HARRIS, D.C. Química Analítica Cuantitativa, 5ª Ed., Rio de Janeiro, RJ, Ed. LTC, 2001. 861 p.

HASSE, U.; FRICKE, K.; DIAS, D.; SIEVERS, G.; WULFF, H.; SCHOLZ, F. Grain boundary corrosion of the surface of annealed thin layers of gold by OH· radicals. **Journal of Solid State Electrochemistry**, DOI 10.1007/s10008-012-1756-x

HISSNER, F.; MATTUSCH, J.; HEINIG, K. Quantitative determination of sulfur-containing anions in complex matrices with capillary electrophoresis and conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 848, p. 503-513, 1999.

KALAL, H.S.; BEIGI, A.A.M.; FARAZMAND, M.; TASH, S.A. Determination of trace elemental sulfur and hydrogen sulfide in petroleum and its distillates by preliminary extraction with voltammetric detection. **Analyst**, v. 125, p. 903-908, 2000.

KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 81, n.3, p. 321-326, 2003.



KRZNNARIC, D.; CIGLENECKI, I.; COSOVIC, B. Voltammetric investigations of 2-dimethylarsinyl-ethanol sulphide in NaCl and seawater. **Analytical Chimica Acta**, v. 431, p. 269-278, 2001.

LAIHO, T.; LEIRO, J. A.; LUKKARI, J. XPS study of irradiation damage and different metal-sulfur bonds in dodecanethiol monolayers on gold and platinum surfaces. **Applied Surface Science**, v. 212-213, p. 525-529, 2003.

LEZNA, R. O.; TACCONI, N. R.; ARVIA, A. J. Modulated reflectance spectroscopy and voltammetry of the sulphide / gold system. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 283, p. 319-336, 1990.

LÓPEZ, R.; LAPEÑA, A. C.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Quantitative determination of wine highly volatile sulfur compounds by using automated headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection Critical study and optimization of a new procedure. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 8-15, 2007.

MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Sulphites in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.

MAJCENOVIC, A. B.; SCHNEIDER, R.; LEPOUTRE, J. P.; LEMPEREUR, V. BAUMES, R. Synthesis and Stable Isotope Dilution Assay of Ethanethiol and Diethyl Disulfide in Wine Using Solid Phase Microextraction. Effect of Aging on Their Levels in Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.6653-6658, 2002.

MARDINI, H. A.; BARTLETT, K.; RECORD, C. C. An improved gas chromatographic method for the detection and quantitation of mercaptanas in blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 113, p. 35-47, 1981.

MARISCAL, M. M.; OLMOS-ASAR, J. A.; GUTIERREZ-WING, C.; MAYORALB A.; YACAMAN, M.J. On the atomic structure of thiol-protected gold nanoparticles: a combined experimental and theoretical study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 11785-11790, 2010.

MARTIN, R. L.; GRANT, J. A. Determination of thiophenic compounds by types in petroleum samples. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 649-657, 1965.

MARTÍN-ALFONSO, M. J., PARTA, P. NAVARRO, F. J. GARCÍA-MORALES M., BORDADO J. C. M. DIOGO, A. C. Effect of processing temperature on the bitumen/MDI-PEG reactivity. **Fuel Processing Technology**, v. 90, 525-530, 2009.

MATTIVI, F.; FEDRIZZI, B.; ZENATO, A.; TIEFENTHALER, P.; TEMPESTA, S.; PERENZONI, D.; CANTARELLA, P.; SIMEONI, F.; VRHOVSEK, U. Development of reliable analytical tools for evaluating the influence of reductive winemaking on the quality of Lugana wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p.194-202, 2012.

MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEÃO, C. Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. **Journal of Food Protection**, v. 64, n.6, p.1033-1037, 2002.

MESTRES, A.; GUASCH, J. Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static headspace technique with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 773, p. 261-169, 1997.

MESTRES, A.; MARTÍ, M.P .; BUSTO, O.; GUASCH, J. Simultaneous analysis of thiols, sulphide and disulphides in wine aroma by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 293-197, 1999.

MINATI, L.; SPERANZA, G.; TORRENTO, S.; TONIUTTI, L.; MIGLIARESI, C.; MANIGLIO, D.; FERRARI, M.; CHIASERA, A. Characterization of thiol-functionalized carbon nanotubes on gold surfaces. **Surface Science**, v. 604, p.1414-1419, 2010.

MIURA, N.; YAN, Y.; LU, G.; YAMAZOE, N. Sensing characteristics and mechanism of hydrogen sulfide sensor using stabilized zirconia and oxide sensing electrode. **Sensor and Actuators B**, v. 34, p. 367-372, 1996.

MODI, S. J.; LACOURSE, W. R.; SHANSKY, R. E. Determination of thiol-based additives for biopharmaceuticals by pulsed electrochemical detection following HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 19-25, 2005.

MOHTAT, N.; BYLOOS, M.; SOUCY, M.; MORIN, S.; MORIN, M. Electrochemical evidence of the adsorption of alkanethiols on two sites on Ag (111). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 484, p. 120-130, 2000.

MONTERROSO-MARCO, B.; LÓPEZ-RUIZ, B. pH effect on cysteine and cystine behaviour at hanging mercury drop electrode. **Talanta**, v. 61, p. 733-741, 2003.

OHGI, T.; SHENG, H. Y.; NEJOH, H. Au particle deposition onto self-assembled monolayers of thiol and dithiol molecules. **Applied Surface Science**, v. 130-132, p. 919-924, 1998.

OHIRA, S.; TODA, K. Ion chromatographic measurement of sulfide, methanethiolate, sulfite and sulfate in aqueous and air samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 280-284, 2006.

OLMOS-ASAR, J. A.; RAPALLO, A.; MARISCAL, M. M. Development of a semiempirical potential for simulations of thiol-gold interfaces. Application to thiol-protected gold nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, p. 6500-6506, 2011.

PETROSKI, J.; CHOU, M.; CREUTZ, C. The coordination chemistry of gold surfaces: Formation and far-infrared spectra of alkanethiolate-capped gold nanoparticles. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 694, p. 1138-1143, 2009.

POSSARI, R.; CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L.T. Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold. **Analytica Chimica Acta**, v. 575, p. 172-179, 2006.

PRAKASH, Antioxidant activity. Takes you into the Heart of a Giant Resource, **Medallion Laboratories Analytical Progress**, v. 19, n.2, 2001.

RANKINE, B.C. Hydrogen sulphide production by yeast. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 15, p. 872-877, 1964.

RAUHUT, D.; KÜRBEL, H.; MACNAMARA, K.; GROSSMANN, M. Headspace GC-SCD monitoring of low volatile sulfur compounds during fermentation and in wine. **Analisis**, v. 26, p. 142-145, 1998.

REDINHA, J. S.; PALITEIRO, C.; PEREIRA, J. L. C. Determination of sulfide by square-wave polarography. **Analytica Chimica Acta**, v. 351, p. 115-125, 1997.

REVISTAS DE VINHOS. Disponível em: <[http://www.revistadevinhos.iol.pt/artigo103-sulfuroso\\_e\\_sulfitos](http://www.revistadevinhos.iol.pt/artigo103-sulfuroso_e_sulfitos)> Acesso em: 29 jun. de 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUEZ, J. A.; DVORAK, J.; JIRSAK, T.; LIU, G.; HRBEK, J.; ARAY, Y; GONZALES, C. Coverage Effects and the Nature of the Metal-Sulfur Bond in S/Au(111): High-Resolution Photoemission and Density-Functional Studies. **Journal American Chemical Society**, v. 125, p. 276-285, 2003.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J.; SCHNEIDER, R.; LEPOUTRE, J. P.; RIGOU, P. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5640–5646, 2009.

ROLAND, A.; SCHNEIDER, R.; RAZUNGLES, A.; CAVELIER, F. Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 7355–7376, 2011.

SAN-JUAN, F.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; ESCUDERO, A. 3-Methyl-2-butene-1-thiol: Identification, analysis, occurrence and sensory role of an uncommon thiol in wine, **Talanta** *in press*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.043>.

SCAMPICCHIO, M.; LAWRENCE, N. S.; ARECCHI, A.; COSIO, S.; MANNINO, S. Voltammetric detection of free sulfhydryl compounds in food flours. **Electroanalysis**, v. 19, n. 1, p. 85-90, 2007.

SCAMPICCHIO, M.; LAWRENCE, N. S.; ARECCHI, A.; MANNINO, S. Determination of Sulfite in Wine by Linear Sweep Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 20, n. 4, p. 444–447, 2008.

SCHMITZ, T.; HUCK, C. W.; BERNKOP-SCNÜRCH, A. Characterisation of the thiol-disulphide chemistry of desmopressin by LC,  $\mu$ -LC, LC-ESI-MS and MALDI-Tof. **Amino Acids**, v. 30, p. 35-42, 2006.

SCHNEIDER, T. W.; BUTTRY, D. A. Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Studies of Adsorption and Desorption of Self-Assembled Monolayers of Alkyl Thiols on Gold. **Journal American Chemical Society**, n. 115, p. 12391-12397, 1993.

SCHNEIDER, R.; KOTSERIDIS, Y.; RAY, J. L.; AUGIER, C.; BAUMES, R. Quantitative Determination of Sulfur-Containing Wine Odorants at Sub Parts per Billion Levels. 2. Development and Application of a Stable Isotope Dilution Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3243-3248, 2003.

SCHOLZ, F.; GONZÁLEZ, G. L. L.; CARVALHO, L. M.; HILGEMANN, M.; BRAININA, K. Z.; KAHLERT, H.; JACK, R. S.; MINH, D. T. Indirect electrochemical sensing of radicals and radical scavengers in biological matrices. **Angewandte Chemie International Edition**, n. 46, p. 8079 - 8081, 2007.

SIEBERT, T. E.; SOLOMON, M. R.; POLLNITZ, A. P., JEFFERY, D.W. Selective Determination of Volatile Sulfur Compounds in Wine by Gas Chromatography with Sulfur Chemiluminescence Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9454–9462, 2010.

SITUMORANG, M.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J.; BARNETT, D. A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis. **Analyst**, v. 124, p. 1775-1779, 1999.

SKVORTSOVA, L. I.; KIRYUSHOV, V.N. Determination of trace sulfate ions by stripping voltammetry at a renewed silver electrode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 255-260, 2002.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R., VIEIRA, G. M. J.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPIROPOULOS, A., TANAKA, J., FLERIANOS, I., BISSON, L. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolation of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.51, n.3, p.233-248, 2000.

STASKO, A.; BREZOVA, V.; MAZUR, M.; CERTIK, M.; KALINAK, M.; GESCHEIDT, G. A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. **Food Science and Technology**, n. 41, p. 2126-2135, 2008.

STASKO, A.; BREZOVÁ, V.; MAZÚR, M.; CERTÍK, M.; KALINÁK, M.; GESCHEIDT, G. A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. **Food Science and Technology**, v. 41, p, 2126-2135, 2008.

STEVENS, R. K.; MILIK, J. D.; O'KEEFFE, A. E.; KROST, K. F. Gas Chromatography of reactive sulfur gases in air at the parts-per-billion level. **Analytical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 827-831, 1971.

TORRES, E.; BIEDERMANN, P. U.; BLUMENAU, A. T. The Role of Gold Adatoms in Self-Assembled Monolayers of Thiol on Au(111). **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 109, p. 3466-3472, 2009.

UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/Alimentus/feira/proutro/aguard/ia\\_simples.htm](http://www.ufrgs.br/Alimentus/feira/proutro/aguard/ia_simples.htm)> Acesso em: 07 jul.de 2012.

UGLIANO, M.; TRAVIS, B.; FRANCIS, I. L.; HENSCHKE, P. A. Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 58, p. 12417-12425, 2010.

UGLIANO, M.; TRAVIS, B.; FRANCIS, I. L.; HENSCHKE, P. A. Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12417-12425, 2010.

UMIKER, K. J.; MORRAA, M. J.; CHENGB, I. F. Aqueous sulfur species determination using differential pulse polarography. **Microchemical Journal**, v. 73, p. 287-297, 2002.

VAZQUEZ-LANDAVERDE, P. A.; TORRES, J. A.; QUIAN, M. C. Quantification of trace volatile sulfur compounds in milk by solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. **American Dairy Science Association**, v. 89, p. 2919-2927, 2006.

VERICAT, C.; VELA, M. E.; GAGO, J.; SALVAREZZA, R. C. Sulfur electroadsorption on Au(111). **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 3643-3649, 2004.

VERICAT, C.; VELA, M. E.; SALVAREZZA, R. C. Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 7, p. 3258-3268, 2005.

VIGNAUD, C.; RAKOTOZAFY, L.; FALGUIÈRES, A.; POTUS, J.; NICOLAS, J. Separation and identifications by gel filtration and high-performance liquid chromatography with UV or electrochemical detection of the disulphides produced from cysteine and glutathione oxidation. **Journal of Chromatography A**, v. 1031, p. 125-133, 2004.

VIVARACHO, L. M.; ZAPATA, J.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Analysis, Occurrence, and Potential Sensory Significance of Five Polyfunctional Mercaptans in White Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10184-10194, 2010.

WALCZAK, M. M.; POPENOE, D. D.; DEINHAMMER, R. S.; LAMP, B. D.; CHUNG, C.; PORTER, M. D. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold A Measure of Surface Coverage. **Langmuir**, n. 7, p. 2687-2693, 1991.

WALCZAK, M. M.; ALVES, C. A.; LAMP, B. D.; PORTER, M. D. Electrochemical and X-ray photoelectron spectroscopic evidence for differences in the binding sites of alkanethiolate monolayers chemisorbed at gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 396, p. 103-114, 1995.

WANG, G.; HSIEH, Y.; WANG, L.; PRELUSKY, D.; KORFMACHER, W.A.; MORRISON, R. High-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry for the determination of a thiol compound in plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, p. 215-221, 2003.

WANG, J.; YOON, R. H. AFM Forces Measured between Gold Surfaces Coated with Self-Assembled Monolayers of 1-Hexadecanethiol. **Langmuir**, n. 24, p. 7889-7896, 2008.

WIDRIG, C.A.; CHUNG, C.; PORTER, M.D. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 310, p. 335-359, 1991.

WIERSE, D. G.; LOHRENGEL, M. M.; SCHULTZE, J. W. Electrochemical properties of sulfur adsorbed on gold electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 92, p. 121-131, 1978.

YANG, D. F.; AL-MAZNAI, H.; MORIN, M. Vibrational Study of the Fast Reductive and the Slow Oxidative Desorptions of a Nonanethiol Self-Assembled Monolayer from a Au(111) Single Crystal Electrode. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 101, p. 1158-1166, 1997.

YANG, D. F.; WILDE, C. P.; MORIN, M. Electrochemical Desorption and Adsorption of Nonyl Mercaptan at Gold Single Crystal Electrode Surfaces. **Langmuir**, v. 12, p. 6570-6577, 1996.



YANG, D. F.; WILDE, C. P.; MORIN, M. Studies of the Electrochemical Removal and Efficient Re-formation of a Monolayer of Hexadecanethiol Self-Assembled at an Au(111) Single Crystal in Aqueous Solutions. **Langmuir**, v. 13, p. 243-249, 1997.

YIN, C.; XIA, D. A study of the distribution of sulfur compounds in gasoline produced in China. Part 3. Identification of individual sulfides and thiophenes. **Fuel**, v. 83, p. 433-441, 2004.

ZAYAK, A. T.; HU, Y. S.; CHOO, H.; BOKOR, J.; CABRINI, S.; SCHUCK, P. J.; NEATON, J. B. Chemical Raman Enhancement of Organic Adsorbates on Metal Surfaces. **Physical Review Letters**, n. 106, p. 083003, 2011.

ZHONG, C. J.; PORTER, M. D. Fine structure in the voltammetric desorption curves of alkanethiolate monolayers chemisorbed at gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 425, p. 147-153, 1997.

ZHONG, C. J.; ZAK, J.; PORTER, M. D. Voltammetric reductive desorption characteristics of alkanethiolate monolayers at single crystal au (111) and (110) electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 421, p. 9-13, 1997.