



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**HORMÔNIOS SINTÉTICOS: INVESTIGAÇÃO DO
COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIAS ELETROANALÍTICAS**

Vanessa Oliveira de Jesus

Orientador: Prof^o. Dr. Valdir Souza Ferreira

Campo Grande - 2017

Instituto de Química

Cidade Universitária, s/n - Fone xx067 3345-7011

Av. Senador Filinto Muller nº 1555 - CEP: 79074-460 - Campo Grande (MS)

<https://www.ufms.br> - e-mail: pgquimica.prop@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



HORMÔNIOS SINTÉTICOS: INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ELETROANALÍTICAS

Vanessa Oliveira de Jesus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química – Nível de Doutorado – da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
para obtenção do título de Doutor em Química
(área de concentração: Química).

Orientador: Prof^o. Dr. Valdir Souza Ferreira

Campo Grande - 2017

Instituto de Química

Cidade Universitária, s/n - Fone xx067 3345-7011

Av. Senador Filinto Muller nº 1555 - CEP: 79074-460 - Campo Grande (MS)

<https://www.ufms.br> - e-mail: pgquimica.prop@ufms.br



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO E
DOUTORADO

TERMO DE DEFESA

() – Dissertação (X) – Tese () – Qualificação

ALUNA
Vanessa Oliveira de Jesus

TÍTULO DO TRABALHO
HORMÔNIOS SINTÉTICOS: INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ELETROANALÍTICAS.

Defesa de Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 89/2017) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	INSTITUIÇÃO DE ENSINO	ASSINATURA
Valdir Souza Ferreira	UFMS	
Antonio Rogério Fiorucci	UEMS	
Marcelina Ovelar Solaliendres	UEMS	
Tayla Fernanda Serantoni da Silveira	PNPD- CAPES/UFMS	
Rodrigo Pereira Cavalcante	PNPD- CAPES/UFMS	

Campo Grande, 16 de junho de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais Rubens e Léia, minhas irmãs, Débora e Beatriz, e a todos meus familiares, pelo incentivo e força que, mesmo de longe, nunca faltaram;

A meu esposo, Lucas Dalto Mendes, pela presença em todos os momentos de minha vida, pelo apoio incondicional, por acreditar em mim, sempre me incentivando e estimulando com muito carinho;

Ao Prof^o. Dr. Valdir Souza Ferreira, meu orientador, pela sua amizade, pela paciência, compreensão e acima de tudo, pela confiança em mim depositada;

A Prof^a. Dra. Alessandra Antunes Silveira pela amizade, por todas as horas de dedicação e principalmente pelas sugestões durante a realização deste trabalho;

A Dra. Jacqueline Marques Petroni pela colaboração e amizade;

A todos os professores do Instituto de Química da UFMS que convivi durante este período de doutorado;

A todos os colegas do grupo de pesquisa Eletroanalítica, obrigada pela amizade, convívio, troca de experiências e momentos de descontração;

Aos meus colegas do LP4, LP5 e LP6 pela amizade e conversas no laboratório;

Aos secretários da pós-graduação, Celestino e Ademar, pelos serviços prestados;

A Capes, pela concessão das bolsas de estudos;

A Universidade Federal de Mato grosso do Sul, FUNDECT e CNPq pela oportunidade de realização desta pesquisa e elaboração do presente trabalho de doutorado;

A todos que contribuíram para realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS.....	v
LISTAS DE TABELAS.....	xi
LISTAS DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I: Introdução geral.....	1
1.1 – INTRODUÇÃO.....	2
1.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.2.1 - Anticoncepcionais orais sintéticos.....	3
1.2.2 - Métodos analíticos para determinação de hormônios sintéticos.....	7
1.2.3 - Determinação dos hormônios sintéticos por métodos voltamétricos.....	8
1.2.4 - Surfactantes.....	10
1.3 – OBJETIVOS.....	12
1.3.1 - Objetivo geral.....	12
1.3.2 - Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO II: Determinação eletroanalítica do etinilestradiol utilizando eletrodos impressos.....	13
2.1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1.1 - Eletrodos impressos.....	14
2.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	16
2.2.1 - Reagentes, soluções e amostras.....	16
2.2.2 - Equipamentos.....	17
2.2.3 - Experimentos voltamétricos.....	17
2.2.4 - Preparo das amostras.....	18
2.2.4.1 - Amostra de medicamento.....	18
2.2.4.2 - Amostra de urina.....	18
2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
2.3.1 - Estudo do eletrodo de trabalho.....	19
2.3.2 - Estudo da técnica.....	20
2.3.3 - Estudo do eletrólito de suporte.....	21
2.3.4 - Estudo da concentração do surfactante BCTA.....	28
2.3.5 - Estudo da velocidade de varredura de potencial por VC.....	30
2.3.6 - Otimização dos parâmetros da VOQ.....	34
2.3.6.1 - Frequência de pulso.....	34
2.3.6.2 - Amplitude de pulso.....	36
2.3.6.3 - Incremento de varredura.....	39
2.3.7 - Parâmetros otimizados.....	41
2.3.8 - Curva analítica.....	42
2.3.9 - Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de urina e medicamentos.....	44
CAPÍTULO III: Determinação simultânea de etinilestradiol e acetato de ciproterona.....	49
3.1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	50
3.1.1 - Eletrodos de amálgama.....	50
3.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	51
3.2.1 - Reagentes, soluções e amostras.....	51

2.2.2 - Equipamentos.....	51
3.2.3 - Experimentos voltamétricos.....	52
3.2.4 - Preparo do eletrodo sólido de amálgama de prata.....	52
3.2.5 - Preparo das amostras.....	53
3.2.5.1 - Amostra de medicamento.....	53
3.2.5.2 - Amostra de urina.....	53
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.3.1 - Estudos iniciais.....	54
3.3.2 - Estudo do eletrólito de suporte.....	58
3.3.4 - Otimização dos parâmetros instrumentais.....	60
3.3.4.1 - Estudo do tempo de equilíbrio.....	60
3.3.4.2 - Estudo da velocidade de varredura.....	60
3.3.4.3 - Estudo do incremento de varredura.....	62
3.3.5 - Curva analítica.....	62
3.3.6 - Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de urina e medicamento.....	65
CAPÍTULO IV: Construção de eletrodos impressos de carbono grafite modificado com PVP.....	70
4.1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	71
4.1.1 - Eletrodos impressos modificados.....	71
4.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	74
4.2.1 - Reagentes, soluções e amostras.....	74
4.2.2 - Equipamentos.....	74
4.2.3 - Construção dos eletrodos impressos de carbono grafite modificado com o polímero PVP (EICG – PVP).....	75
4.2.4 - Experimentos voltamétricos.....	76
4.2.5 - Preparo das amostras.....	76
4.2.5.1 - Amostra de medicamento.....	76
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.3.1 - Estudos iniciais.....	76
4.3.2 - Estudo de diferentes proporções de aglutinante.....	77
4.3.3 - Estudo de diferentes proporções do agente modificador (PVP).....	78
4.3.4 - Estudos de repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade.....	81
4.3.5 - Aplicação eletroanalítica do eletrodo impresso de carbono grafite modificado com o polímero PVP.....	83
4.3.5.1 - Estudo do eletrólito de suporte.....	85
4.3.5.2 - Otimização dos parâmetros da VOQ.....	87
4.3.5.3 - Curva analítica.....	89
4.3.5.4 - Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de medicamentos.....	90
CAPÍTULO V: Considerações finais.....	93
CAPÍTULO VI: Referências bibliográficas.....	95

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1: Fórmulas estruturais dos hormônios sintéticos: (A) etinilestradiol e (B) acetato de ciproterona.....	6
FIGURA 2: Estruturas químicas dos surfactantes: (A) Neutro: Triton X-100; (B) Catiônico: brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) e (C) Aniônico: dodecil sulfato de sódio (SDS)	11
FIGURA 3: Eletrodo impresso de carbono. A: eletrodo de trabalho; B: contra eletrodo; C: eletrodo de referência; D: contato do contra eletrodo; E: contato do eletrodo de referência e F: contato do eletrodo de trabalho. Dimensões correspondem a 3,4 x 1,0 x 0,05 centímetros (comprimento x largura x espessura) (Adaptado, DROP SENS).....	14
FIGURA 4: A - Diagrama ilustrando como um nanotubo de carbono é formado a partir da folha de grafite. B - Representação esquemática de nanotubos de carbono de parede simples. C - Representação esquemática nanotubos de carbono de parede múltipla (SOUZA FILHO & FAGAN, 2007; ZARBIN & OLIVEIRA, 2013).....	16
FIGURA 5: Esquema para o preparo das amostras de medicamentos.....	18
FIGURA 6: Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 8,0). Velocidade de varredura (v): 50 mV s ⁻¹	20
FIGURA 7: Voltamogramas registrados para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 8,0), em diferentes técnicas. Condições para VOQ: $t_{eq} = 15$ s, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV; para VPD: $t_{eq} = 15$ s, $t_{modulação} = 0,05$ s, intervalo de tempo = 0,5 s, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 40,05$ mV e para VVL: $t_{eq} = 15$ s, $v = 100$ mV s ⁻¹ e $\Delta E = 4,95$ mV.....	21
FIGURA 8: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , em diferentes pHs. Condições: $t_{eq} = 15$ s, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV.....	22
FIGURA 9: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹	22
FIGURA 10: Efeito dos surfactantes catiônico, neutro e aniônico. (A) Voltamogramas registrados no pH 4,0. (B) Voltamogramas registrados no pH 6,0. (C) Voltamogramas registrados no pH 8,0.....	24
FIGURA 11: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ e BCTA $2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , em diferentes pHs. Condições: $t_{eq} = 15$ s, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV.....	25
FIGURA 12: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ e BCTA $2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	26
FIGURA 13: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ e BCTA $2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , em diferentes pHs. Condições: $t_{eq} = 15$ s, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV.....	27
FIGURA 14: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ e BCTA $2,5 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	28
FIGURA 15: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ em diferentes	

concentrações de BCTA.....	29
FIGURA 16: A - Representação esquemática do surfactante BCTA (abaixo da concentração CMC) adsorvido na interface eletrodo-solução. B - Molécula de BCTA – extremidade hidrofílica e hidrofóbica.....	30
FIGURA 17: Voltamogramas cíclicos para oxidação eletroquímica de etinilestradiol em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 6 e BCTA 1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em diferentes velocidades de varreduras.....	31
FIGURA 18: Variação do E _p versus ν , para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ na presença de BCTA (1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ nos pHs 3, 6 e 9.....	32
FIGURA 19: Variação da I _p versus ν , para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ na presença de BCTA (1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ nos pHs 3, 6 e 9.....	32
FIGURA 20: Variação do log I _p versus log ν , para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ na presença de BCTA (1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ nos pHs 3, 6 e 9.....	33
FIGURA 21: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ (pH = 5,0) e BCTA 1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em diferentes frequências. Condições: t _{eq} = 15s, ΔE = 4,95 mV e E _{sw} = 19,95 mV.....	35
FIGURA 22: Variação da corrente de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ em diferentes frequências.....	36
FIGURA 23: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ e BCTA 1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em diferentes amplitudes de pulsos. Condições: t _{eq} = 15s, f = 20 Hz e ΔE = 4,95 mV.....	37
FIGURA 24: Variação da corrente de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ em diferentes amplitudes de pulsos.....	38
FIGURA 25: Variação do potencial de pico em função da amplitude de pulso para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹	39
FIGURA 26: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ e BCTA 1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em diferentes incrementos de varredura. Condições: t _{eq} = 15s, f = 20 Hz e E _{sw} = 30 mV.....	40
FIGURA 27: Variação da corrente de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol 2,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ em diferentes incrementos de varredura.....	41
FIGURA 28: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ na presença de BCTA (1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b-i) (0,33-2,6)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de EE2. Inserção: Variação da corrente pico em função da concentração de EE2. Condições: t _{eq} = 15s, f = 20 Hz, E _{sw} = 30 mV e ΔE = 7,05 mV.....	42
FIGURA 29: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão acetato 0,04 mol L ⁻¹ , contendo 40uL de urina isento de etinilestradiol na presença de BCTA (1,6x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b-i) (0,33-2,6)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de EE2. Inserção: Variação da corrente de pico em função da concentração de EE2. Condições: t _{eq} = 15s, f = 20 Hz, E _{sw} = 30 mV e ΔE = 7,05 mV.....	43
FIGURA 30: Voltamogramas onda quadrada registrados em meio de tampão acetato	

- 0,04 mol L⁻¹ pH 6,0, na presença de BCTA (1,6x10⁻⁴ mol L⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra de urina fortificada com EE2 (40,4mg L⁻¹), (c-e) adições sucessivas da solução padrão do EE2. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{eq} = 15s, f = 20$ Hz, $E_{sw} = 30$ mV e $\Delta E = 7,05$ mV..... 45
- FIGURA 31:** Voltamogramas onda quadrada registrados em meio de tampão acetato 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0, na presença de BCTA (1,6x10⁻⁴ mol L⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra A, (c-e) adições sucessivas da solução padrão do EE. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{eq} = 15s, f = 20$ Hz, $E_{sw} = 30$ mV e $\Delta E = 7,05$ mV..... 47
- FIGURA 32:** Voltamogramas onda quadrada registrados em meio de tampão acetato 0,04 mol L⁻¹ pH 5,0, na presença de BCTA (1,6x10⁻⁴ mol L⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra de B, (c-e) adições sucessivas da solução padrão do EE2. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{eq} = 15s, f = 20$ Hz, $E_{sw} = 30$ mV e $\Delta E = 7,05$ mV..... 47
- FIGURA 33:** Processo de fabricação eletrodo de amalgama. (A) Empacotamento de nano pó de prata e fio de platina (contato elétrico). (B) Processo de amalgamação. (C) Polimento disco sólido amalgamado..... 53
- FIGURA 34:** Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ (A) e de acetato de ciproterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ (B) em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença e na ausência do surfactante catiônico BCTA (1,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹). Condições: $t_{eq} = 5s, \Delta E = 3,00$ mV e $\nu = 150$ mV s⁻¹ 54
- FIGURA 35:** Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ (A) e de acetato de ciproterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ (B) em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença e na ausência do surfactante neutro Triton X-100 (1,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹). Condições: $t_{eq} = 5s, \Delta E = 3,00$ mV e $\nu = 150$ mV s⁻¹..... 55
- FIGURA 36:** Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol e acetato de ciporterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença do surfactante neutro Triton X-100 (1,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹). Condições: $t_{eq} = 5s, \Delta E = 3,00$ mV e $\nu = 150$ mV s⁻¹ 55
- FIGURA 37:** Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ (A) e de acetato de ciproterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ (B) em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença e na ausência do surfactante aniônico DSS (1,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹). Condições: $t_{eq} = 5s, \Delta E = 3,00$ mV e $\nu = 150$ mV s⁻¹... 56
- FIGURA 38:** (A) Variação da corrente e potencial de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0 em diferentes concentrações de BCTA. (B) Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹. Condições: $t_{eq} = 5s, \Delta E = 3,00$ mV e $\nu = 150$ mV s⁻¹..... 57
- FIGURA 39:** (A) Variação da corrente e potencial de pico para redução eletroquímica de acetato de ciproterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0 em diferentes concentrações de BCTA. (B) Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de acetato de ciproterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹. Condições: $t_{eq} = 5s, \Delta E = 3,00$ mV e $\nu = 150$ mV s⁻¹ 57
- FIGURA 40:** Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ e de acetato de ciproterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹). Condições: $t_{eq} = 5s, \Delta E = 3,00$ mV e $\nu = 150$ mV s⁻¹..... 58
- FIGURA 41:** Variação da corrente (A) e potencial (B) de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ e acetato de ciproterona 1,0x10⁻⁵ mol L⁻¹

¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ em diferentes pHs na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹).....	59
FIGURA 42: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e de acetato de ciproterona 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ em pH: 8,0 na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹). Condições: t _{eq} = 5s, ΔE = 3,00 mV e ν = 150 mV s ⁻¹	59
FIGURA 43: Variação da corrente de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e acetato de ciproterona 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0 na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) em diferentes tempos de equilíbrio.....	60
FIGURA 44: Variação da corrente (A) e potencial (B) de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e acetato de ciproterona 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) em diferentes velocidades de varredura.....	61
FIGURA 45: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e de acetato de ciproterona 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) em diferentes velocidades de varredura (a-f) 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mV s ⁻¹ . Condições: t _{eq} = 15s e ΔE = 3,00 mV.....	61
FIGURA 46: (A) Variação da corrente pico. (B) Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e de acetato de ciproterona 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) em diferentes velocidades de varredura. Condições: t _{eq} = 15s, e ν = 200 mV s ⁻¹	62
FIGURA 47: (A) Variação da corrente pico em função da concentração do EE2, mantendo a concentração de AC 5,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . (B) Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) em diferentes concentrações de EE2: (a) Eletrólito de suporte, (b-g) (0,64-3,8)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Condições: t _{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s ⁻¹	63
FIGURA 48: (A) Variação da corrente pico em função da concentração do AC, mantendo a concentração de EE2 1,9x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . (B) Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) em diferentes concentrações de AC: (a) Eletrólito de suporte, (b-g) (1,5-9,0)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Condições: t _{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s ⁻¹	63
FIGURA 49: Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b-g) (0,64-3,8)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de EE2 (pico 1) e (1,5-9,0)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de AC (pico 2). Inserção: Variação da corrente pico em função da concentração de (A) EE2 e (B) AC. Condições: t _{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s ⁻¹	65
FIGURA 50: Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra de urina fortificada com EE2 (6,5mg L ⁻¹) e AC (8,4mg L ⁻¹), (c-e) adições sucessivas da solução padrão dos hormônios. Inserção: Curvas de recuperações do EE2 (A) e AC (B). Condições: t _{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s ⁻¹	66
FIGURA 51: Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra medicamento (amostra C) com EE2 (0,035mg) e AC (2,0mg), (c-e) adições sucessivas da solução padrão dos hormônios. Inserção: Curvas de recuperações do EE2 (A) e AC (B). Condições: t _{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s ⁻¹	68
FIGURA 52: Fórmulas estruturais do PVP.....	73

FIGURA 53: Processo de fabricação dos EICG – PVP. (A) Eletrodo impresso comercial descartável com a remoção o eletrodo de trabalho. (B) Posicionamento do molde. (C) Transferência da mistura. (D) Eletrodo finalizado.....	75
FIGURA 54: Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L ⁻¹ na presença e ausência do modificador PVP.....	77
FIGURA 55: Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L ⁻¹ em diferentes proporções de parafina.....	78
FIGURA 56: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L ⁻¹ em diferentes proporção de PVP. (B) Variação da corrente de pico anódica em função da proporção de PVP.....	79
FIGURA 57: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L ⁻¹ em diferentes velocidade de varredura para o eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m). (B) Variação da corrente de pico catódica e anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.....	80
FIGURA 58: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L ⁻¹ em 100 ciclos contínuo. (B) Variação da corrente e potencial de pico anódica em função ao número de ciclos.....	82
FIGURA 59: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L ⁻¹ em diferentes eletrodos com a mesma proporção e composição. (B) Variação da corrente e potencial de pico anódica em função a diferentes de eletrodos.....	82
FIGURA 60: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L ⁻¹ em diferentes dias com um mesmo eletrodo. (B) Variação da corrente e potencial de pico anódica em função ao número de dias.....	83
FIGURA 61: Voltamogramas registrados para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 8,0), em diferentes técnicas. Condições para VOQ: $t_{eq} = 15s$, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV; para VPD: $t_{eq} = 15s$, $t_{modulação} = 0,05$ s, intervalo de tempo = 0,5 s, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 40,05$ mV e para VVL: $t_{eq} = 15s$, $v = 100$ mV s ⁻¹ e $\Delta E = 4,95$ mV.....	84
FIGURA 62: Representação da interação do polímero (PVP) com o analito etinilestradiol.....	85
FIGURA 63: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , em diferentes pHs. Condições: $t_{eq} = 15s$, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV.....	86
FIGURA 64: Variação da corrente (A) e potencial (B) de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ em diferentes pHs.....	86
FIGURA 65: (A) Variação da corrente de pico (B) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 6,0 em diferentes frequências de pulsos. Condições: $t_{eq} = 15s$, $E_{sw} = 19,95$ mV e $\Delta E = 4,95$ mV.....	87
FIGURA 66: (A) Variação da corrente de pico (B) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 6,0 em diferentes amplitudes de pulsos. Condições: $t_{eq} = 15s$, $f = 20$ Hz e $\Delta E = 4,95$ mV.....	88
FIGURA 67: (A) Variação da corrente de pico (B) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 6,0 em diferentes incrementos de pulsos. Condições: $t_{eq} = 15s$, $f = 20$ Hz, e $E_{sw} = 40$ mV.....	89
FIGURA 68: Voltamogramas de onda quadrada registrados meio de tampão BR 0,04	

mol L⁻¹ pH 6,0 para: (a) Eletrólito de suporte, (b-h) (0,34-4,4)x10⁻⁶ mol L⁻¹ de EE2.
Inserção: Variação da corrente pico em função da concentração de EE2. Condições: t_{eq} = 15s, f = 20 Hz, E_{sw} = 40 mV e ΔE = 4 mV..... 89

FIGURA 69: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 6,0 para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra medicamento (amostra A) com EE2 (0,035mg), (c-e) adições sucessivas da solução padrão do hormônio.
Inserção: Curva de recuperação. Condições: t_{eq} = 15s, f = 20 Hz, E_{sw} = 40 mV e ΔE = 4 mV..... 91

FIGURA 70: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 6,0 para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra medicamento (amostra B) com EE2 (0,035mg), (c-e) adições sucessivas da solução padrão do hormônio.
Inserção: Curva de recuperação. Condições: t_{eq} = 15s, f = 20 Hz, E_{sw} = 40 mV e ΔE = 4 mV..... 91

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1: Anticoncepcionais utilizados no Brasil, componentes, doses, nomes comerciais e classificação.....	5
TABELA 2: Propriedades químicas e físicas do etinilestradiol (ARIZ, et al., 2014; CLOUZOT, et al., 2008).....	6
TABELA 3: Propriedades químicas e físicas do acetato de ciproterona (LIU, et. al., 2011).....	7
TABELA 4: Valores de média e desvio padrão para corrente e potencial de pico para uma solução de EE2 $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ sem o uso do surfactante e na presença de diferentes tipos de surfactantes adicionado ao eletrólito de suporte.....	23
TABELA 5: Valores de coeficiente angular obtidos para a variação de log I _p versus log v.....	34
TABELA 6: Descrição do estudo dos parâmetros de aplicação da VOQ.....	34
TABELA 7: Parâmetros selecionados para análise de etinilestradiol pela técnica de VOQ em EINC - PM.....	41
TABELA 8: Parâmetros quantitativos obtidos a partir das curvas analíticas na presença e ausência da matriz na análise de etinilestradiol por VOQ em EINC - PM na presença de BCTA.....	44
TABELA 9: Resultados das curvas de recuperação obtidas para amostra de urina fortificada com o hormônio sintético EE2.....	46
TABELA 10: Resultados dos valores encontrados de EE2 para amostras de medicamentos A e B.....	48
TABELA 11: Parâmetros quantitativos obtidos a partir das curvas analíticas para a análise simultânea dos hormônios sintéticos etinilestradiol e acetato de ciproterona.....	64
TABELA 12: Resultados das curvas de recuperação obtidas para amostra de urina fortificada com os hormônios sintéticos EE2 e AC.....	67
TABELA 13: Resultados dos valores encontrados de EE2 para amostra de medicamento (amostra C).....	68
TABELA 14: Valores de área eletroativa, fator de rugosidade, resistência de transferência de elétrons e constante de velocidade heterogênea padrão.....	81
TABELA 15: Parâmetros quantitativos obtidos a partir das curvas analíticas na análise de etinilestradiol por VOQ em EICG - PVP.....	90
TABELA 16: Resultados dos valores encontrados para amostras de medicamentos (amostra A e B).....	92

LISTAS DE ABREVIações E SIGLAS

[] = concentração

ΔE = incremento de varredura

ΔE_s = incremento de varredura de potencial

AC = acetato de ciproterona

$A_{\text{eletroativa}}$ = Área eletroativa

$A_{\text{geométrica}}$ = Área geométrica

AgESA = eletrodo sólido de amálgama de prata

ANVISA = Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

BCTA = brometo de cetiltrimetilamônio

BR = tampão Britton-Robinson

CG = Cromatografia Gasosa

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

D = Coeficiente difusional

DG = desogestrel

DSS = dodecil sulfato de sódio

EE2 = etinilestradiol

EIC = eletrodo impresso de carbono

EICG – PVP = eletrodo impresso de carbono grafite modificado com o polímero PVP

EIE = Espectroscopia de impedância eletroquímica

EINC - PM = eletrodo impresso de nanobuto de carbono de parede múltipla

EINC - PU = eletrodo impresso de nanotubo de carbono de parede única

E_p = potencial de pico

ESA = eletrodo sólido de amálgama

E_{sw} = amplitude de pulso

f = frequência

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

I_p = corrente de pico

IUPAC = União Internacional de Química Pura e Aplicada

K° = Constante heterogênea

LD = limite de detecção

LNG = levonorgestrel

Listas de abreviações e siglas

LQ = limite de quantificação

NT = norestiterona

Pesquisa Nacional de Saúde = PNS

pH = potencial hidrogeniônico

PVP = polivinilpirrolidona

r = coeficiente de correlação

Rct = resistência de transferência de elétrons

rpm = rotações por minuto

DPR = desvio padrão relativo

t_{eq} = tempo de equilíbrio

V = volt

VC = voltametria cíclica

VOQ = voltametria de onda quadrada

VPD = voltametria de pulso diferencial

vs. = versus

VVL = voltametria de varredura linear

v = velocidade de varredura

RESUMO

Nos últimos anos, o uso de anticoncepcionais orais vem sendo muito utilizado pelas mulheres e apresentam eficácia bem elevada quando comparada aos outros métodos contraceptivos, esse medicamento é constituído basicamente de dois hormônios sintéticos, tais como etinilestradiol (EE2) e acetato de ciproterona (AC). Estes hormônios podem trazer efeitos adversos sobre o organismo humano, além disso, eles são eliminados através da urina promovendo contaminação ambiental. Portanto, neste trabalho foram propostos três novos métodos alternativos para determinação destes hormônios em diversas amostras. A primeira metodologia desenvolvida mostrou a possibilidade de determinação do hormônio sintético EE2 em amostras de urina e medicamento empregando eletrodos impressos modificados com nanotubos de carbono de parede múltipla (EINC - PM) e a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). Usando as condições otimizadas, o método apresentou resposta linear no intervalo de concentração de $3,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $2,14 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Na segunda metodologia mostrou-se a possibilidade de determinação simultânea dos hormônios sintéticos EE2 e AC em amostras de urina e medicamento empregando a técnica de voltametria de varredura linear (VVL) utilizando o eletrodo sólido de amálgama de prata (AgESA). Neste método a presença do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) proporcionou uma boa separação dos picos, o primeiro observado em torno de -0,85 V, atribuído à redução do EE2, e o segundo em torno de -1,20 V referente à redução do AC. Após a otimização dos parâmetros instrumentais, curvas analíticas foram construídas obtendo-se LD de $6,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para EE2 e para AC, respectivamente. A terceira metodologia eletroanalítica desenvolvida mostrou a possibilidade de determinar o hormônio sintético EE2 em amostras de medicamentos empregando a técnica de VOQ. Este método permite a utilização de um eletrodo impresso de baixo custo de montagem, ou seja, a partir de eletrodos que seriam descartados (eletrodo impresso de carbono grafite modificado com polivinilpirrolidona – EICG - PVP), estes eletrodos foram construídos manualmente e caracterizados por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). As três metodologias apresentaram bons resultados com limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) adequados e valores satisfatórios para os estudos de recuperação, além disso, os métodos propostos podem ser adaptados para análises de campo.

Palavras-chave: anticoncepcionais orais, determinação eletroanalítica e hormônios sintéticos.

ABSTRACT

In recent years, the use of oral contraceptives has been widely used by women and have good high efficiency compared to other contraceptive methods, this pharmaco consists basically of two synthetic hormones, such as ethinyl estradiol (EE2) and cyproterone acetate (AC). These hormones may have adverse effects on the human organism, in addition, they are eliminated through urine promoting environmental contamination. Therefore, in this work we have been proposed three new alternative methods for determination of these hormones in several samples. The first methodology showed the possibility of the determination the EE2 synthetic hormone in urine and drug employing multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed electrodes (MWCNT-SPCEs) and square wave voltammetry technique (SWV). Using the optimized condition, the method presented linear response in the concentration range of 3.3×10^{-7} mol L⁻¹ to 2.8×10^{-6} mol L⁻¹, with detection limit of 2.14×10^{-8} mol L⁻¹. The second methodology showed the possibility of simultaneous determination of synthetic hormones in EE2 and AC urine and drug employing the linear sweep voltammetry technique (LSV) and Silver solid amalgam electrodes (AgSAE). In this method the presence of the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) afforded good separation of the peaks, the first observed in -0.85 V, assigned on reduction of EE2, and the second observed on -1.20 V assigned on reduction of AC. After the instrumental parameters optimization, analytical curves were constructed obtaining LD of 6.6×10^{-8} mol L⁻¹ and 1.2×10^{-7} mol L⁻¹ for EE2 and for AC, respectively. The third electroanalytical methodology developed showed the possibility of determining the synthetic hormone EE2 in pharmaceutical samples using the SWV technique. This method involved applicability of using a screen-printed electrode low cost manufacturing (polyvinylpyrrolidone graphite carbon modified screen-printed electrodes – PVPGC SPCEs), these electrodes were manually construct and characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The three methods showed good results with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) adequate and satisfactory values for the recovery studies, additionally, the proposed methods might be easily adapted for on-site analysis.

Key Words: oral contraceptives, electroanalytical determination and synthetic hormone.

CAPÍTULO I: Introdução geral



1.1 - INTRODUÇÃO

Um medicamento é qualquer substância utilizada para diagnóstico, alívio, tratamento, prevenção e cura de doenças. A palavra fármaco é destinada a todas as substâncias químicas (princípio ativo), que possuam ação farmacológica podendo ser definidas como micromoléculas bioativas, que exercem efeitos terapêuticos a partir de interações específicas com um receptor ou uma biomacromolécula. Entretanto, outro exemplo de fármaco são os que afetam a estrutura e/ou o funcionamento do organismo, como os anticoncepcionais orais, que não interferem no processo de uma doença (<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/> acessado em 18 de fevereiro de 2016).

Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, na segunda metade do século XIX, muitos dos medicamentos foram produzidos, com isso proporcionaram mudanças expressivas no tratamento de diversas doenças, alterando a sua evolução, com significativa melhora da qualidade e da expectativa de vida. Mas muito poucos provocaram, desde o seu lançamento, tanto impacto no comportamento das pessoas, levando a debates e polêmicas, no âmbito científico, social, religioso, moral e ético, como a pílula anticoncepcional. A primeira foi produzida e lançada nos EUA em 1960; a segunda, de origem alemã, no ano seguinte, na Europa e Austrália. A pílula continua sendo, até hoje, a primeira opção entre os métodos anticoncepcionais, em quase todo mundo. No Brasil, ela surgiu em 1962, considerando as mulheres de 18 a 49 anos de idade sexualmente ativas e que ainda menstruavam, 61,1% fizeram uso de métodos para evitar a gravidez, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2013 (IBGE, 2015).

Nas últimas décadas, o uso de anticoncepcional tem sido adotado por um grande número de mulheres, por se tratar de um método acessível de contracepção e em geral de baixo custo, que possibilitou a emancipação sexual e financeira da mulher. Contudo, o uso deste medicamento pode trazer efeitos adversos sobre o organismo humano e organismo aquáticos.

As vantagens em utilizar estes métodos contraceptivos são por aliviar a dismenorreia (cólica menstrual), melhorar a acne e tensão pré-menstrual, diminuir fluxo menstrual e o risco de gravidez tubária (fora do útero) e, além disso, o sangramento menstrual pode ser programado (HERTER & ACCETTA, 2001). As desvantagens são as doenças, tais como

trombose, câncer de mama, entre outras, que pode ser causadas pelos efeitos colaterais e as contaminações ambientais (LOBO & ROMÃO, 2011; FREIRE, et al., 2011).

Mulheres que tomam anticoncepcionais eliminam hormônios sintéticos através de suas excreções como a urina e fezes. Esses hormônios podem passar inertes nas estações de tratamento de esgoto convencionais, conseqüentemente serem lançados aos córregos e lagos, onde contamina o ambiente aquático provocando um desequilíbrio na reprodução e fertilidade de peixes (LIU, et al., 2011).

Devido aos fatores de contaminação citados, estes hormônios despertam grande preocupação da comunidade científica, tanto pela eficiência como pela quantidade contínua introduzida no ambiente. Assim tem-se a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias que possam ser utilizadas para o monitoramento destes hormônios em diferentes tipos amostras, com o custo reduzido e métodos rápidos. Nesse contexto, as técnicas eletroanalíticas mostram-se promissoras ferramentas, já que exibem reduzido custo, grande rapidez aliada a uma considerável seletividade, sensibilidade e simplicidade no tratamento das amostras.

1.2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 - ANTICONCEPCIONAIS ORAIS SINTÉTICOS

Os anticoncepcionais orais sintéticos foram introduzidos no mercado pela primeira vez e usados na década de 1960 e continuam sendo um método altamente eficaz contra gravidez. Os anticoncepcionais hormonais orais, também chamados de pílulas anticoncepcionais são comprimidos que contêm dois hormônios sintéticos (estrogênio e progestogênio) parecidos com os produzidos pelo ovário da mulher. Na combinação desses dois hormônios, tenta-se “enganar” o organismo feminino a não produzir aqueles hormônios naturais e, assim, impedindo de ocorrer.

No cérebro, há uma glândula chamada hipófise, que produz os hormônios FSH (Folículo Hormônio Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante), que estimulam a produção de estrógeno e progesterona no ovário. O FSH e o LH aumentam e diminuem no decorrer do mês e quando atingem um nível máximo no organismo, induzem a produção do estrógeno e da progesterona. Com a ingestão da pílula, doses de hormônios sintéticos semelhantes ao estrógeno e à progesterona são introduzidas no organismo. Assim, a hipófise não produz FSH nem LH, pois o cérebro entende que sua presença não é necessária. O desenvolvimento dos

folículos ovarianos é interrompido nos primeiros estágios de crescimento e nenhum atinge o estágio de folículo maduro (<http://gpquae.iqm.unicamp.br/>, acesso em 18 de fevereiro de 2016).

As pílulas são métodos muito eficazes quando usados corretamente e consistentemente, podendo sua taxa de falha ser da ordem de 0,1%, no primeiro ano de uso. A formulação de anticoncepcionais hormonais podem ser classificadas: (<http://www.anticoncepcao.org.br/>, acesso em 18 de fevereiro de 2016; WANNMACHER, 2003).

- Combinadas que se compõem de um estrogênio associado a um progestogênio, dividem-se em monofásicas, bifásicas e trifásicas. As monofásicas são os mais comuns, todos os comprimidos ativos têm a mesma composição e dose. As bifásicas e as trifásicas contêm dois e três tipos de comprimidos ativos, respectivamente, de diferentes cores, com os mesmos hormônios em proporções diferentes. (http://www.anticoncepcao.org.br/Anticoncepcionais_orais_combinados.pdf, acesso em 18 de fevereiro de 2016; WANNMACHER, 2003).
- Minipílulas ou apenas com progestogênio são constituídas por progestogênio isolado. (http://www.anticoncepcao.org.br/Anticoncepcionais_orais_combinados.pdf, acesso em 18 de fevereiro de 2016; WANNMACHER, 2003).

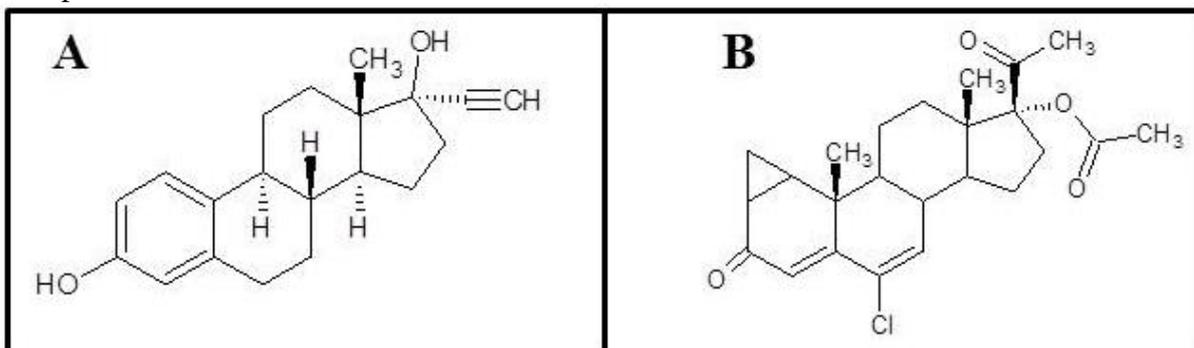
A seguir são apresentados, na **Tabela 1**, os principais anticoncepcionais usados pelas mulheres no Brasil.

TABELA 1: Anticoncepcionais utilizados no Brasil, componentes, doses, nomes comerciais e classificação.

Pílulas	Nome comercial	Componente	Dose	Apresentação	
Monofásicas	Diane 35	Etinilestradiol (EE2) Acetato de ciproterona(AC)	0,035mg 2mg	21 comprimidos	
	Selene				
	Diclin				
	Repopil				
	Microvlar	Levonorgestrel (LNG) EE2	0,15mg 0,03mg	21 comprimidos	
	Ciclo 21				
	Nociclin				
	Gestrelan				
Bifásicas	Gracial	Desogestrel (DG)	0,025mg 0,125mg	7 comprimidos: EE2 0,04mg + DG 0,025mg	
		EE2	0,04mg 0,03mg	15 comprimidos: EE2 0,03mg + DG 0,125mg	
Trifásicas	Trinovum	EE2	0,035mg 0,035mg 0,035mg	7 comprimidos: EE2 0,035mg + NT 0,5mg	
			Noretisterona (NT)	0,5mg 0,55mg	7 comprimidos: EE2 0,035mg + NT 0,75mg
				1,0mg	7 comprimidos: EE2 0,035mg + NT 1,0mg
	Triquilar Trinordial	LNG	0,05mg 0,075mg 0,125mg	6 comprimidos: EE2 0,03mg + LNG 0,05mg	
			EE2	0,03mg 0,04mg	5 comprimidos: EE2 0,04mg + LNG 0,075mg
				0,03mg	10 comprimidos: EE2 0,03mg + LNG 0,125mg
Minipílulas	Micronor	NT	0,35 mg	35 comprimidos	
	Nortrel	LNG	0,03 mg	35 comprimidos	

Os hormônios sintéticos etinilestradiol e acetato de ciproterona são amplamente utilizados para a formulação de anticoncepcionais. Na **Figura 1** são apresentadas as fórmulas estruturais destes dois hormônios.

FIGURA 1: Fórmulas estruturais dos hormônios sintéticos: (A) etinilestradiol e (B) acetato de ciproterona.



O etinilestradiol é um hormônio sintético utilizado em quase todas as formulações dos anticoncepcionais. Ele é derivado do hormônio natural estradiol, a única diferença é a adição do radical etinil no carbono 17, a presença deste radical faz com que o EE2 seja mais resistente à degradação do que o natural (ARIZ, et al., 2014; CLOUZOT, et al., 2008).

A partir das propriedades químicas e físicas do EE2 encontrados na **Tabela 2**, pode-se notar que o coeficiente de partição octanol-água é relativamente alto, portanto podemos considerar que é um composto orgânico hidrofóbico com uma baixa volatilidade e resistente a biodegradação (ARIZ, et al., 2014).

TABELA 2: Propriedades químicas e físicas do etinilestradiol (ARIZ, et al., 2014; CLOUZOT, et al., 2008; <https://chemicalize.com>, acesso em 09 de agosto de 2017).

Nome comum	Etinilestradiol
Nome químico	19-Nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17-diol,
Massa molar	296,4 g mol ⁻¹
Características físicas	Pó cristalino, branco ou levemente amarelo, inodoro
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
log K _{ow}	4,14
Ponto de fusão	182-184 °C
Solubilidade em água	11,3 mg L ⁻¹ 27 °C
pKa	10,4
Tempo de vida	4 - 5 dias

O acetato de ciproterona é um hormônio sintético da progesterona mais utilizado, derivado da 17 α -hidroxiprogesterona, ele possui propriedades antiandrogênica, ou seja, atua no tratamento de doenças associadas aos hormônios sexuais masculinos, os quais também estão presentes no organismo feminino em pequena quantidade, é bem mais potente em relação à outros hormônios sintético da progesterona. O AC é associado com o EE2 para o tratamento de determinadas doenças, na mulher, tais como a acne, doenças que se manifestam

por um excesso de pelos (hirsutismo), e, também, como contraceptivo oral em mulheres sofrendo destas doenças (PATEL & SAGAR, 2012; EL-ENANY, et. al., 2010). A **Tabela 3** apresenta algumas propriedades químicas e físicas do AC.

TABELA 3: Propriedades químicas e físicas do acetato de ciproterona (<https://chemicalize.com>, acesso em 09 de agosto de 2017; LIU, et. al., 2011).

Nome comum	Acetato de ciproterona
Nome químico	17-acetato de 6-cloro-1- β ,2- β -dihidro-17-hidroxi-3'H-ciclopropa[1,2]pregna-1,4,6-trieno-3,20-diona
Massa molar	416,94 g mol ⁻¹
Características físicas	pó cristalino branco
Fórmula molecular	C ₂₄ H ₂₉ ClO ₄
log K _{ow}	3,1
Ponto de fusão	200-201 °C
Solubilidade em água	51,7 mg L ⁻¹ 27 °C
pKa	12,7
Tempo de vida	4 - 5 dias

1.2.2 - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS SINTÉTICOS

Vários métodos têm sido utilizados para a determinação de hormônios sintéticos, incluindo a espectrofotometria (SOURI, et al., 2005), cromatografia líquida de alta eficiência (MSIGALA, et. al., 2017; SILVA, et al., 2013; PATEL & SAGAR, 2012), cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (WENKUI, et al., 2005; TWADDLE, et al., 2003) e cromatografia líquida com detecção UV e UV/fluorescência (ARSOVA-SARAFINOVSKA, et al., 2006). Tais métodos são precisos, sensíveis e seletivos, mas trabalhosos e relativamente de alto custo. Desta forma, novos métodos de análise para a determinação de hormônios sintéticos são de grande interesse, principalmente se o custo for reduzido, envolvendo menos etapas de preparo de amostra e menor consumo de solventes.

Assim, as técnicas eletroanalíticas surgem com uma alternativa para a determinação dos hormônios sintéticos utilizados em anticoncepcionais, pois além de simples e de baixo custo, elas oferecem a possibilidade de se determinar a concentração do composto de interesse diretamente na amostra, sem pré-tratamentos ou separações prévias. As técnicas eletroanalíticas estão sendo cada vez mais utilizadas nas mais diversas áreas do conhecimento, com o objetivo de se obter informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de

eletrodos modificados, exemplificam algumas das aplicações das técnicas eletroanalíticas. (SOUZA, et al., 2003).

1.2.3 - DETERMINAÇÃO DOS HORMÔNIOS SINTÉTICOS POR MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS

Por meio de pesquisa na literatura, constata-se que são poucos os trabalhos que têm sido dedicados para investigar o comportamento eletroquímico e o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para determinação de hormônios sintéticos utilizados em anticoncepcionais, mesmo diante da grande potencialidade destas técnicas. A seguir são apresentados alguns trabalhos que utilizam técnicas voltamétricas na análise de hormônios sintéticos.

El-Enany e colaboradores (2010) estudaram o comportamento voltamétrico do acetato de ciproterona utilizando eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho e as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e a de corrente contínua (CC). Este método apresentou curvas analíticas com resposta linear no intervalo de 3,2-32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a CC e 0,5-14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a VPD, os limites de detecção determinados foram 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso em amostra comercial (Diane-35).

Ghoneima e colaboradores (2004) investigaram o comportamento eletroquímico do levonorgestrel, utilizando eletrodo de gota pendente de mercúrio e a técnica de VC, os resultados mostraram a presença apenas de um pico de redução (processo irreversível) envolvendo dois elétrons. Ainda desenvolveram uma metodologia para determinação de levonorgestrel por voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva (VOQRCA) em eletrólito de suporte pH 3. Sob as condições otimizadas, a corrente de pico mostrou uma resposta linear com a concentração de levonorgestrel. A metodologia desenvolvida foi aplicada com sucesso em amostras de comprimidos, em soro humano e amostra de plasma real de voluntários saudáveis.

Outro trabalho relevante de Ghoneima e colaboradores (2007), utilizaram eletrodo de mercúrio e as técnicas de VC e CC para estudar o comportamento eletroquímico de noretisterona. Os resultados indicaram um processo irreversível envolvendo dois elétrons na redução. Para quantificação de noretisterona em amostra de comprimidos (Steronato) utilizaram a técnica de VOQ redissolução catódica adsortiva e solução tampão pH 5 como eletrólito. Aplicando um potencial de deposição de -0,6 V a 130s, a corrente de pico

apresentou uma resposta linear num intervalo de 5×10^{-9} a 3×10^{-7} mol L⁻¹, os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $1,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e 5×10^{-9} mol L⁻¹, respetivamente.

Li Chunya em 2007 estudaram o comportamento eletroquímico de etinilestradiol em eletrodo de pasta de carbono na presença de surfactante catiônico brometo de cetilpiridínio, a presença do surfactante deslocou o potencial de oxidação e a corrente de pico aumenta de forma significativa. Em condições ótimas, a corrente de pico de oxidação é proporcional à concentração de etinilestradiol no intervalo de $5,0 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para um tempo de acumulo de 150s por VVL. O processo proposto foi aplicado com sucesso para a quantificação de etinilestradiol em amostra farmacêutica e os resultados foram satisfatórios em comparação com a CLAE.

Em 2006, Ghoneima e colaboradores desenvolveram uma metodologia voltamétrica para a quantificação de etinilestradiol em amostras farmacêutica, soro e plasma humano. Utilizaram a técnica de VOQ, eletrodo de gota pendente de mercúrio e tampão Britton-Robinson (BR) pH 7. Os limites de detecção e quantificação foram calculados como sendo $5,9 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e $1,9 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, respetivamente.

Martinez e colaboradores (2012) desenvolveram um método para determinação de etinilestradiol em amostras de água usando a técnica de VOQ e VC, os autores utilizaram eletrodos de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e partículas magnéticas como suporte de bioafinidade para capturar e pré-concentrar etinilestradiol em amostras de água. O método proposto foi aplicado com sucesso para a determinação do etinilestradiol na amostra de água além de oferecer um limite de detecção satisfatório, da ordem de 0,01ng L⁻¹.

Em 2015, Pavinatto e colaboradores desenvolveram um método para determinação de etinilestradiol utilizando a técnica de VOQ e um novo material eletródico. Este dispositivo foi construído usando um eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor, este eletrodo foi revestido com camadas nanoestruturadas de quitosano e nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Os resultados através da VC mostram que o processo de oxidação eletroquímica do EE2 é irreversível e controlado por absorção. Este método apresentou uma resposta linear para a concentração no intervalo de 0,05 a 20 μmol L⁻¹, com um limite de detecção de 0,09 μmol L⁻¹.

Perez e colaboradores em 2016, por sua vez desenvolveram uma metodologia eletroanalítica para a análise de etinilestradiol em amostra de águas naturais. O trabalho foi baseado no uso de eletrodo de diamante dopado com boro e as técnicas de VC para o estudo

comportamental e VOQ para a determinação analítica. Foi obtido um único pico de oxidação no potencial de 0,65V vs. Ag/AgCl com características de uma reação irreversível. Os resultados mostram também que o processo de oxidação é controlado pela adsorção da espécie eletroativa e que existem dois elétrons envolvidos. Um intervalo linear de concentração foi obtido entre $7,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $5,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $2,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Em 2016, Nunes e colaboradores desenvolveram uma metodologia para a determinação de EE2 em amostras de água sem pré tratamento usando a técnica de VPD, os autores utilizaram eletrodo de gota pendente de mercúrio e tampão BR pH 7,0 como eletrólito de suporte. Este método apresentou uma linearidade na faixa de concentração de 2,0 a 96,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ usando um tempo de acumulação de 150s. Os limites de detecção e quantificação foram calculados como sendo $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,63 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

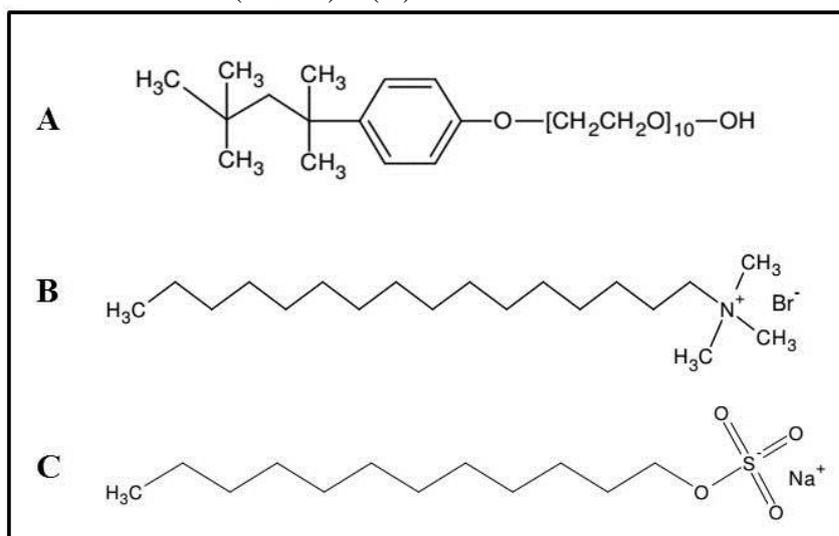
1.2.4 – SURFACTANTES

A utilização de surfactantes na área de eletroanalítica possuem importantes propriedades que são capazes de modificar o ambiente de análise. Com base nos resultados reportados na literatura (ARAÚJO, et al., 2010; CARAMIT, et al., 2013; ARAUJO, et al. 2015; PETRONI, et al., 2016), os quais relatam que o uso de surfactantes tem fornecido resultados bastante satisfatórios em termos de solubilidade, intensidade de corrente, melhora na resposta eletroquímica, além de diminuir o efeito de matriz na superfície do eletrodo.

Os tensoativos, também chamados de surfactantes, são compostos anfipáticos, orgânicos ou organometálicos que formam coloides ou micelas em solução. A definição da palavra surfactante é baseada na contração da frase em inglês que descreve “surface-active agents”. Estes possuem uma superfície ativa, devido à concentração de determinadas espécies em uma região interfásica: ar-água, óleo-água ou sólido-líquido (MANIASSO, 2001).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica (insolúvel em água) e uma porção hidrofílica (solúvel em água). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica - parte hidrofílica é um ânion ou catiônica - parte hidrofílica é um cátion), não iônica (hidrofílica não é iônica) ou anfótero (porção hidrofílica dependem do pH) (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Na **Figura 2** são apresentadas as estruturas químicas dos surfactantes utilizados no presente trabalho.

FIGURA 2: Estruturas químicas dos surfactantes: (A) Neutro: Triton X-100; (B) Catiônico: brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) e (C) Aniônico: dodecil sulfato de sódio (DSS).



Em soluções diluídas as moléculas dos surfactantes apresentam-se dispersas, enquanto que em soluções mais concentradas organizam-se em agregados moleculares, que geralmente contêm de 50 a 100 moléculas, denominados micelas. A principal razão que leva os monômeros de surfactantes a se associarem sob a forma de micelas é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água. A concentração onde se inicia o processo de formação das micelas, micelização, é denominada concentração micelar crítica (CMC), que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica. São as micelas as responsáveis pela catálise micelar e pela solubilização de gorduras (RIZZATTI, et al., 2009).

Devido à sua estrutura molecular única, o surfactante está sendo amplamente utilizado nos campos de eletroquímica e eletroanalítica. O uso de surfactantes pode aumentar a solubilidade de substâncias orgânicas, alterar as propriedades da interface eletrodo/solução e subsequentemente influenciar os processos eletroquímicos, ou seja, a adsorção de um surfactante sobre a superfície do eletrodo pode facilitar de forma significativa a transferência de elétrons, aumentar a corrente de pico, alterar os potenciais redox, assim como alterar a estabilidade dos produtos intermediários (VITTAL, et al., 2006; HUANG, 2005; BEHPOUR, et al., 2016).

1.3 - OBJETIVOS

1.3.1 - Objetivo geral

- Desenvolver métodos eletroanalíticos para a determinação de hormônios sintéticos (EE2 e AC) comumente encontrados em anticoncepcionais.

1.3.2 - Objetivos específicos

- Desenvolver metodologias eletroanalíticas para determinação do hormônio EE2 em amostra de urina e medicamento comercial, utilizando eletrodos impressos modificados com nanotubos de parede múltipla como eletrodo de trabalho.
- Desenvolver um método eletroanalítico para determinação simultânea dos hormônios EE2 e AC em amostra de medicamento e urina, empregando eletrodo sólido de amálgama de prata.
- Construir e caracterizar eletrodos impressos de carbono grafite modificado com PVP para determinação de EE2 em amostras de medicamento por meios de técnicas eletroanalíticas.
- Avaliar a influência do uso de surfactantes catiônico, aniônico e neutro na determinação dos hormônios em estudo.

CAPÍTULO II: Determinação eletroanalítica do etinilestradiol utilizando eletrodos impressos

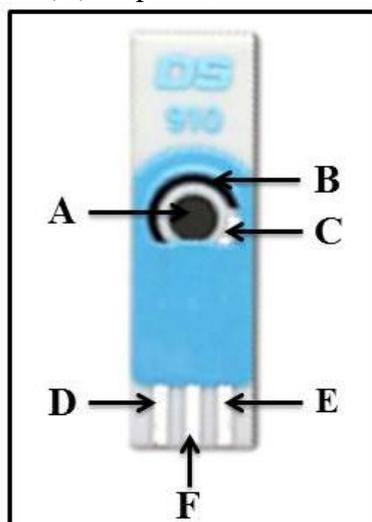
2.1 - REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo apresentam-se uma breve introdução sobre o material eletródico utilizado (eletrodo impresso), os procedimentos adotados, os resultados obtidos e a discussão para a determinação eletroanalítica do etinilestradiol, em diferentes eletrodos impressos, analisando a influência do eletrólito de suporte com diferentes valores de pH, diferentes tipo de surfactantes e recorrendo as diferentes técnicas voltamétricas.

2.1.1 - ELETRODOS IMPRESSOS

Eletrodos impressos (EIs) tem recebido grande destaque na área de eletroanalítica, eles consistem geralmente de um filme depositado sobre um suporte inerte, geralmente de PVC ou cerâmica de alumina. Em geral, este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e outra área para ser a superfície do eletrodo na outra extremidade (NASCIMENTO & ANGNES, 1995). Uma das principais atrações destes tipos de eletrodos é a facilidade de utilização, com apresentação de um sistema completo, contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, impressos no mesmo suporte (NASCIMENTO & ANGNES, 1995; MISTRY, et. al., 2015). Na **Figura 3** é apresentada uma representação de um eletrodo impresso.

FIGURA 3: Eletrodo impresso de carbono. **A:** eletrodo de trabalho; **B:** contra eletrodo; **C:** eletrodo de referencia; **D:** contato do contra eletrodo; **E:** contato do eletrodo de referencia e **F:** contato do eletrodo de trabalho. Dimensões correspondem a 3,4 x 1,0 x 0,05 centímetros (comprimento x largura x espessura) (Adaptado, DROP SENS).

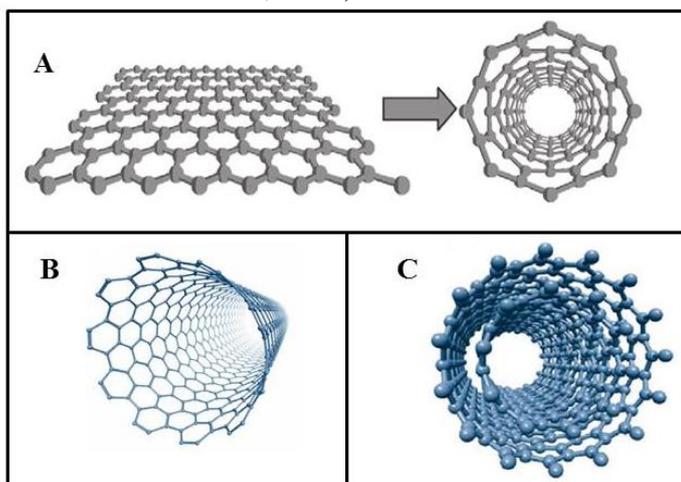


Estes EIs são de fácil fabricação, possibilitando a produção de um grande número em tempo curto a um custo extremamente baixo. A tecnologia é simples e apropriada para a produção de eletrodos descartáveis, fatores determinantes no desenvolvimento de versões comercializáveis para o público menos especializado. Além disso, estes eletrodos têm apresentado sensibilidade, seletividade, estabilidade, precisão, resposta rápida, facilidade de uso e robustez, requisitos básicos para análise rotineira em processos industriais (TRINDADE, 2009).

As possibilidades de modificações das superfícies dos EIs se assemelham aos eletrodos de pasta de carbono, uma vez que, em princípio, todos os artifícios utilizados para modificação dos eletrodos de pasta de carbono se adequam aos EIs. A modificação (adição de espécies) na superfície do eletrodo de trabalho altera a natureza físico química da interface eletrodo de trabalho/solução contribuindo para uma melhor seletividade e sensibilidade (NASCIMENTO & ANGNES, 1995). Um dos materiais que vem sendo utilizados são os nanotubos de carbono em função de suas apresentam propriedades eletrônicas, óticas e mecânicas muito interessantes, desta forma, esses materiais têm sido utilizados na modificação dos eletrodos.

Nanotubo de carbono são conceitualmente construídos como sendo formado a partir de uma folha de grafite (grafeno) enrolada em forma cilíndrica, com “um átomo de espessura”, como ilustrado na **Figura 4A** (SOUZA FILHO & FAGAN, 2007). Existem dois tipos de nanotubos de carbono: os nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS), **Figura 4B** e nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM), **Figura 4C**. Os NTCPS são constituídos por uma única folha de grafite perfeitamente enrolada num tubo cilíndrico e os NTCPM compreendem diversos cilindros concêntricos de folhas de grafeno (BAUGHMAN, 2002).

FIGURA 4: **A** - Diagrama ilustrando como um nanotubo de carbono é formado a partir da folha de grafite. **B** - Representação esquemática de nanotubos de carbono de parede simples. **C** - Representação esquemática nanotubos de carbono de parede múltipla (SOUZA FILHO & FAGAN, 2007; ZARBIN & OLIVEIRA, 2013).



2.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.2.1 - REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau analítico e a água utilizada foi ultrapura (resistividade 18,2 M Ω cm) obtida por um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore).

A solução do padrão etinilestradiol (Sigma ALdrich) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ foi preparada pela dissolução da massa apropriada em 10 mL de etanol (99.6%, Dinamica). A solução foi transferida para frasco de cor âmbar e estocada sob refrigeração até ser utilizada.

Para realizar as medidas voltamétricas foram utilizados como eletrólito de suporte tampão Britton-Robinson (BR) que foi preparada pela mistura dos ácido acético (Merck), ácido bórico (Merck) e ácido fosfórico (Merck), todos com concentração de 0,04 mol L $^{-1}$ e tampão acetato foi preparado a partir de uma solução de ácido acético 0,04 mol L $^{-1}$ (Merck). Em ambos os tampões o pH foi ajustado com hidróxido de sódio (Merck) 1,0 mol L $^{-1}$.

Procurando obter melhores resultados na detecção de EE2, foram feitas medidas utilizando adição de soluções de três surfactantes: neutro, triton X-100 (TX-100, Acros Organics), aniônico, dodecil sulfato de sódio (DSS, Sigma) e o catiônico, brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA, SERVA). Estas soluções foram preparadas pela dissolução em água ultrapura.

As amostras de medicamentos utilizadas para a determinação de EE2 foram obtidas em farmácias situadas na cidade de Campo Grande – MS. As amostras de urina foram coletadas de indivíduos isentos do hormônio EE2. A coleta foi realizada segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.2.2 - EQUIPAMENTOS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo GPSTAT 128N (Eco Chemie), interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9 (Eco Chemie) para aquisição dos dados. Para fazer a conexão dos eletrodos impressos ao potenciostato utilizou-se um conector específico da Dropsens (ref. CAC).

Utilizou-se uma balança Sartorius R160 para realizar todas as pesagens.

Foram utilizados um pH-metro digital (TecnoPON/modelo MPA-20), juntamente com um agitador magnético TM 125 Shott para o ajuste do pH das soluções eletrolíticas.

As adições de volumes na célula eletroquímica e as diluições das soluções foram realizadas com o auxílio de micropipetas HTL Série LABMATE, com capacidade de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL e de 100 a 1000 μL .

Na preparação das amostras foram utilizados banho ultrassom UNIQUE modelo USC-1800A e uma centrífuga da Sigma Laborzentrifugen (Modelo no 94199-2002, Germany) para separação do sobrenadante.

Os eletrodos impressos utilizados foram adquiridos da empresa DropSens, este eletrodos são compostos por três partes: eletrodo pseudo referencia de prata, contra eletrodo de carbono e o eletrodo de trabalho (4,0 mm de diâmetro) de nanotubos de carbono funcionalizados com íons carboxílicos em parede única (EINC – PU) e em parede múltipla (EINC – PM) e também, eletrodo impresso de carbono (EIC).

2.2.3 - EXPERIMENTOS VOLTAMÉTRICOS

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando eletrodo impresso como eletrodo de trabalho. Para a realização dos experimentos, alíquotas apropriadas de solução estoque de EE2 e de surfactantes foram diluídas em 10,0 ml de solução do eletrólito de suporte no pH desejado. Antes de cada medida, lavou-se a superfície do eletrodo de trabalho com água deionizada, em seguida, lavou-se com etanol e deixou-se em repouso durante

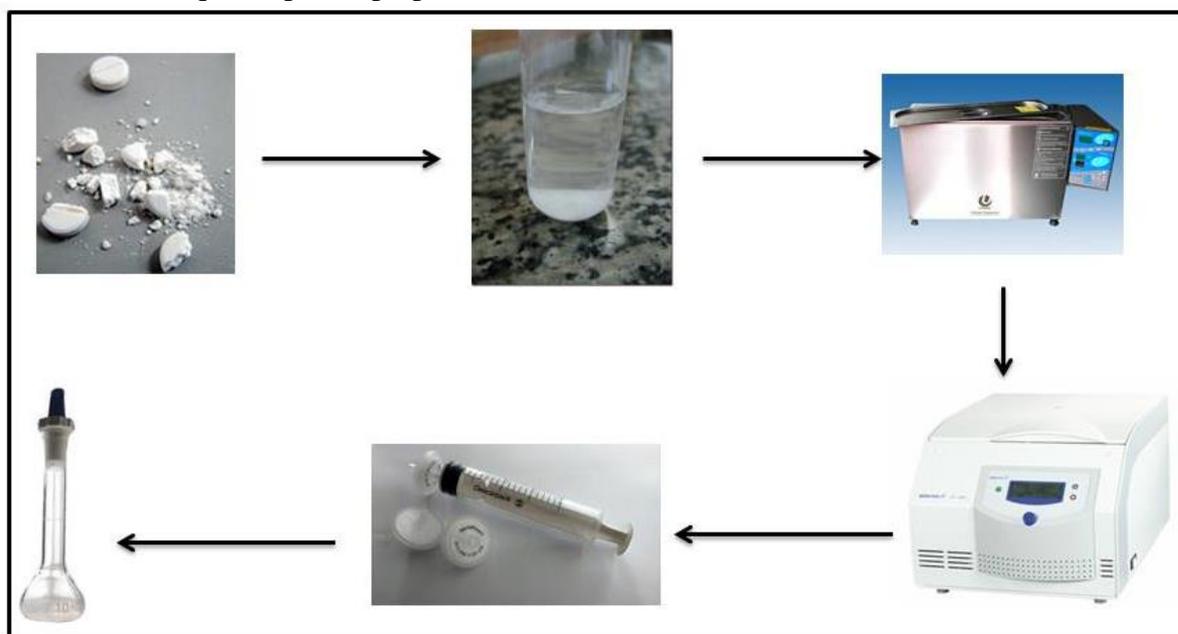
aproximadamente 2 minutos. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente.

2.2.4 - PREPARO DAS AMOSTRAS

2.2.4.1 - AMOSTRA DE MEDICAMENTO

Foram utilizadas duas amostra de medicamentos (amostra A e B) para a determinação de EE2. Ambas as amostras foram preparadas das seguintes formas: Primeiramente pesou-se a massa de 5 comprimidos triturados em um tubo de ensaio, adicionou-se 3 mL de etanol. Após, a mistura foi levada para o ultrassom durante 5 minutos, a seguir o material foi separado por centrifugação durante cerca de 5 minutos a 4000rpm. A camada sobrenadante foi filtrada com o auxílio de uma seringa e filtro (nylon) 0,45 μ m em um balão volumétrico, este procedimento foi repetido 3 vezes, após esta etapa completou-se o balão volumétrico com etanol. A seguir esta solução foi submetida a análise eletroanalítica e a quantificação de EE2 na amostra de medicamento, utilizando o método de adição de padrão. O esquema da **Figura 5** ilustra o procedimento realizado para o preparo da amostra.

FIGURA 5: Esquema para o preparo das amostras de medicamentos.



2.2.4.2 - AMOSTRA DE URINA

As amostras de urina isentas do hormônio analisado foram coletadas em frascos de vidro e armazenadas em geladeira para a conservação até a realização das análises. As

amostras de urina foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e foram fortificadas com etinilestradiol em concentrações de 10, 40 e 80 mg L⁻¹. Estes níveis de fortificação foram selecionados a partir dos resultados obtidos por meio da curva analítica, primeiramente foi adicionada a amostra fortificada na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito de suporte, em seguida foram efetuadas adições de solução estoque de EE2.

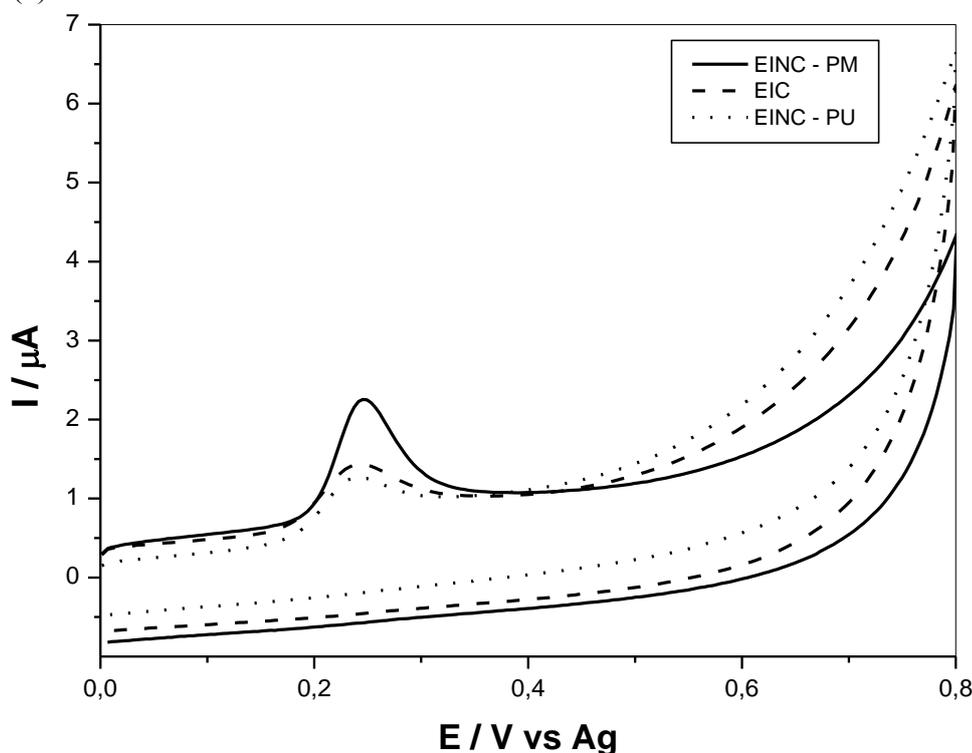
2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 - ESTUDO DO ELETRODO DE TRABALHO

A etapa inicial do estudo consistiu em realizar testes para avaliar qual eletrodo impresso apresenta uma maior sensibilidade para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica para detecção eletroquímica do etinilestradiol, desta forma, foram realizados experimentos utilizando solução 1,0×10⁻⁵ mol L⁻¹ de etinilestradiol em tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹ (pH 8,00), em diferentes eletrodos impressos, dentre eles eletrodo impresso de carbono (EIC), eletrodo impresso de nanobuto de carbono de parede múltipla (EINC – PM) e eletrodo impresso de nanotubo de carbono de parede única (EINC – PU).

Na **Figura 6**, são apresentados os voltamogramas cíclicos registrados após varredura na direção anódica de 0,0 a 0,8 V a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ para o EINC – PM (—), EIC (- - -) e EINC – PU (· · · · ·). Ao analisar a Figura 6, nota-se um perfil voltamétrico bem definido e uma maior intensidade de corrente de pico anódica (I_{pa}) para o eletrodo impresso EINC – PM. Por este motivo, esse eletrodo foi escolhido para dar continuidade aos experimentos.

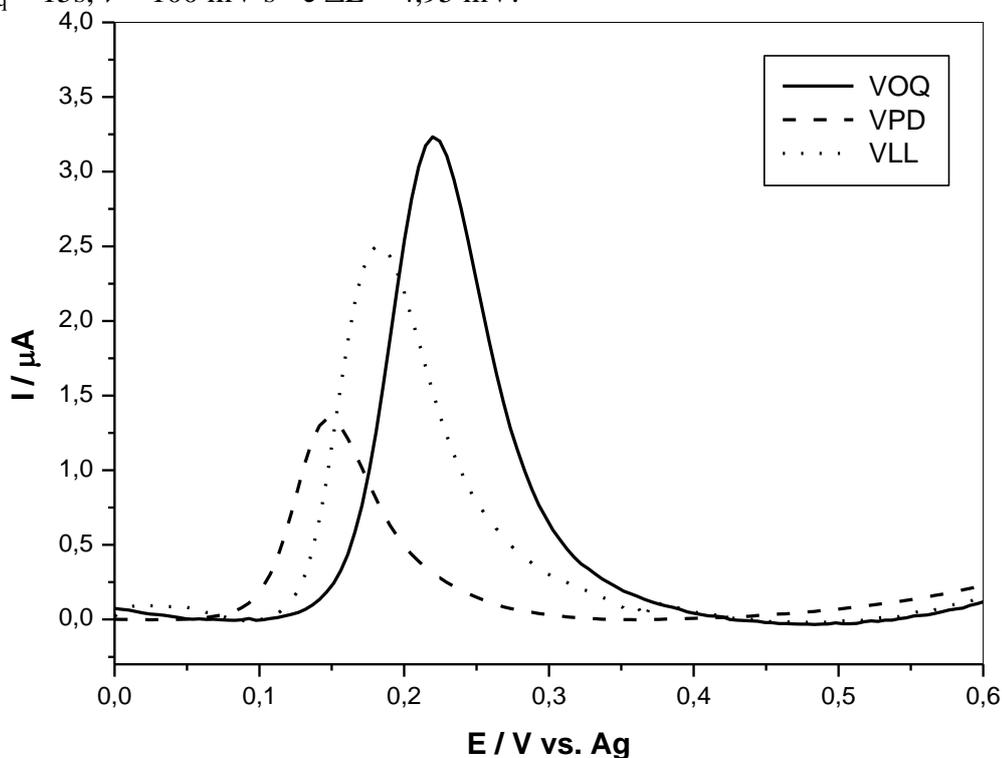
FIGURA 6: Voltamogramas cíclicos registrados para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0). Velocidade de varredura (v): 50 mV s^{-1} .



2.3.2 - ESTUDO DA TÉCNICA

A escolha da técnica voltamétrica é uma etapa essencial na busca de sensibilidade analítica do eletrodo ao analito. As técnicas de pulso são as mais sensíveis entre as técnicas voltamétricas, pois minimizam a contribuição da corrente capacitiva na leitura da corrente correspondente a reação eletroquímica do composto de estudo. As técnicas utilizadas para investigar a oxidação eletroquímica do etinilestradiol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram voltametria de onda quadrada (VOQ) (**Figura 7 voltamograma** —), voltametria de pulso diferencial (VPD) (**Figura 7 voltamograma** - - -) e a voltametria de varredura linear (VVL) (**Figura 7 voltamograma** ····). O sinal do analito na VOQ apresentou corrente de pico superiores aos valores obtidos nas técnicas de VPD e VVL. Como pode ser observado também, o sinal analítico obtido na VOQ exibiu uma boa definição com excelente resolução, conseqüentemente, esta técnica foi selecionada para o desenvolvimento da metodologia.

FIGURA 7: Voltamogramas registrados para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), em diferentes técnicas. Condições para VOQ: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 19,95 \text{ mV}$; para VPD: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$, $t_{\text{modulação}} = 0,05 \text{ s}$, intervalo de tempo = $0,5 \text{ s}$, $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 40,05 \text{ mV}$ e para VVL: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$.



2.3.3 - ESTUDO DO ELETRÓLITO DE SUPORTE

Na maioria das determinações eletroanalítica de compostos orgânicos, o pH do meio pode afetar a resposta voltamétrica da molécula em estudo. Por este motivo, a avaliação deste parâmetro é de suma importância. O efeito do pH do eletrólito de suporte na reação de oxidação eletroquímica do etinilestradiol foi estudado na faixa de 2,0 a 9,0, utilizou-se tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, que permite uma ampla variação de pH.

A **Figura 8** apresenta os voltamogramas de onda quadrada para oxidação do etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pHs. A **Figura 9** refere-se ao gráfico da influência do pH na corrente e potencial de pico de oxidação do hormônio sintético.

FIGURA 8: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes pHs. Condições: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 19,95 \text{ mV}$.

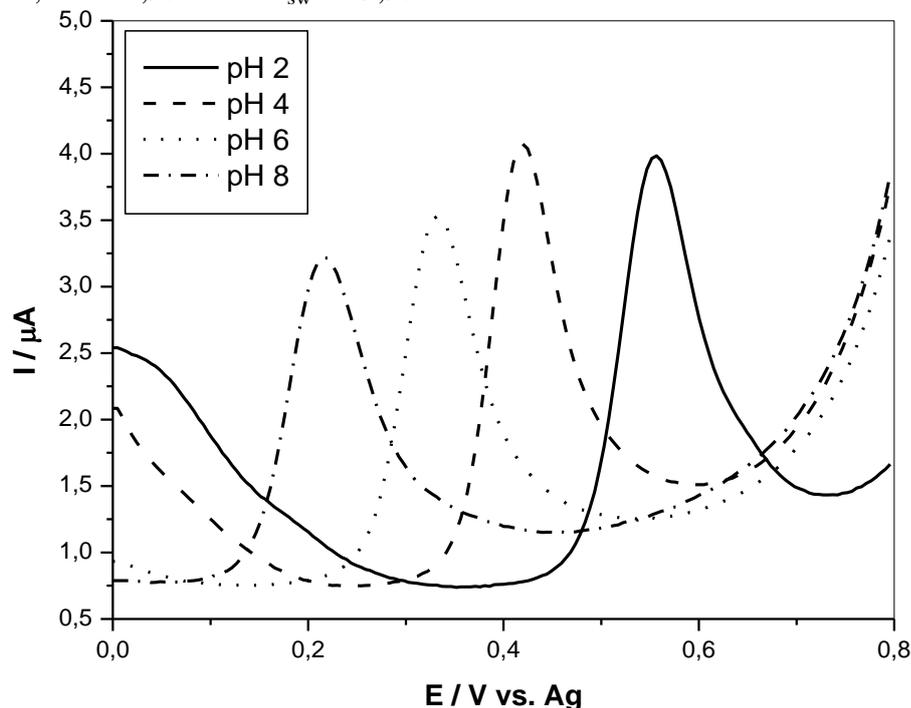
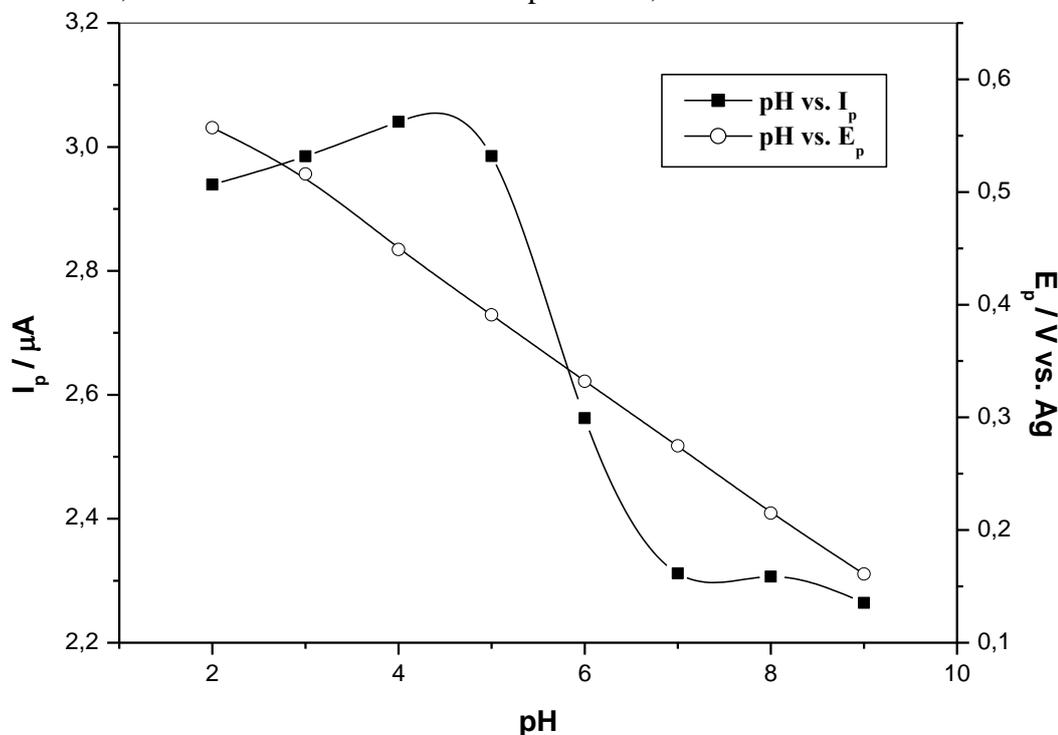


FIGURA 9: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$.



Analisando as **Figuras 8 e 9**, observa-se que o potencial e a intensidade de corrente de pico mostram-se dependentes do pH do meio, ou seja, os potenciais de pico deslocam-se no sentido de valores negativos com o aumento do pH, indicando que a transferência

eletrônica é dependente do pH do meio. Nota-se ainda um aumento da corrente pico o pH 4,0, a partir do qual a corrente diminuiu gradualmente até pH 9,0.

A fim de melhorar a detectabilidade e o perfil voltamétrico do sistema foram realizados testes com diferentes surfactantes. Os surfactantes investigados foram de três tipos: catiônico (Brometo de Cetiltrimetilamônio – BCTA), neutro (Triton X – 100) e aniônico (Dodecil Sulfatode Sódio – DSS).

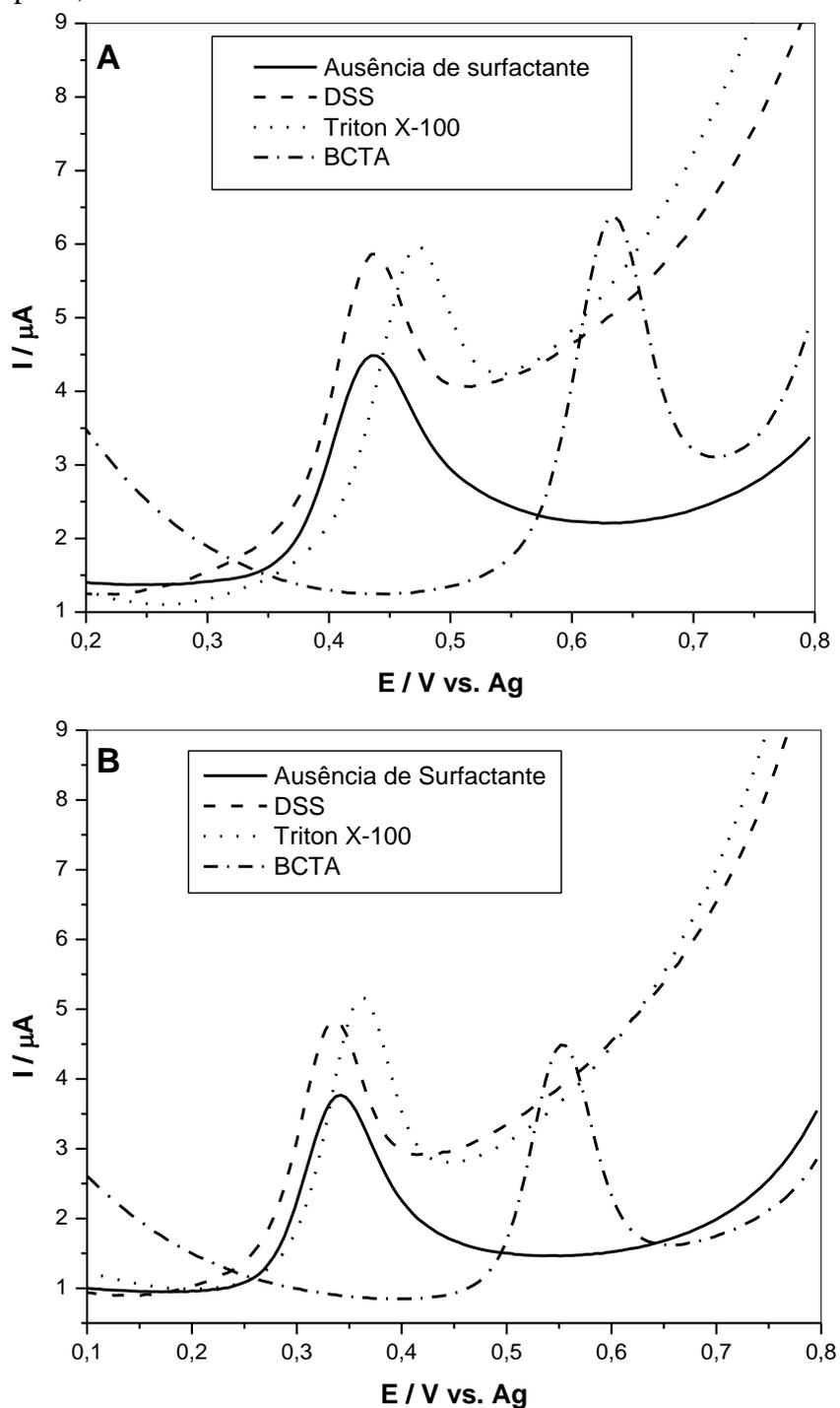
Na **Tabela 4** apresentam os resultados utilizando diferentes tipos de surfactantes neutro (Triton X-100), catiônico (BCTA) e aniônico (DSS) em diferentes pHs do meio. Por meio da **Tabela 4** podemos verificar que a utilização de surfactante catiônico (BCTA) proporcionou uma melhora na corrente de pico do EE2 na presença dos eletrólitos de suporte tampão BR pH 4 e 6, enquanto para o pH 8 a utilização do surfactante aniônico (DSS) apresentou um pequeno aumento da corrente de pico.

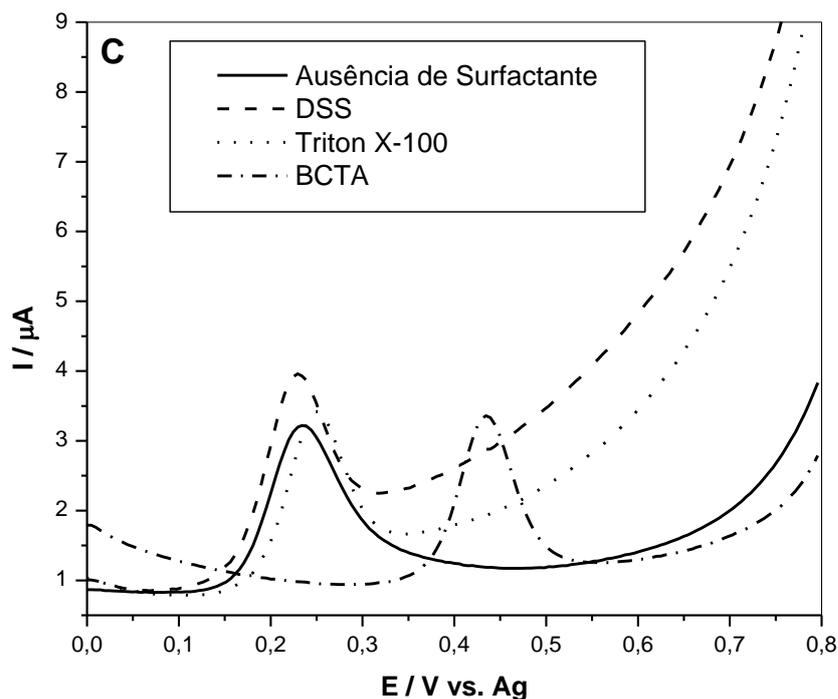
TABELA 4: Valores de média e desvio padrão para corrente e potencial de pico para uma solução de EE2 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sem o uso do surfactante e na presença de diferentes tipos de surfactantes adicionado ao eletrólito de suporte.

Eletrólito de suporte	Surfactantes	E_p / V	$I_p / \mu A$
Tampão BR pH 4	Ausência	0,435±0,009	2,814±0,097
	DSS ($6,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,435±0,009	2,945±0,027
	Triton X-100 ($3,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,470±0,003	2,929±0,027
	BCTA ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,647±0,012	4,040±0,104
Tampão BR pH 6	Ausência	0,342±0,000	2,563±0,032
	DSS ($6,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,332±0,000	2,774±0,026
	Triton X-100 ($3,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,359±0,003	3,120±0,084
	BCTA ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,552±0,000	3,184±0,049
Tampão BR pH 8	Ausência	0,236±0,003	2,281±0,175
	DSS ($6,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,229±0,000	2,394±0,022
	Triton X-100 ($3,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,247±0,003	2,219±0,023
	BCTA ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	0,433±0,003	2,253±0,032

Na **Figura 10** apresenta os voltamogramas de onda quadrada registrados nos pHs 4,0 (**Figura 10A**), 6,0 (**Figura 10B**) e 8,0 (**Figura 10C**) na presença dos surfactantes BCTA, Triton X-100 e o DSS, podemos verificar que a presença do surfactante BCTA há um descolamento do pico do etinilestradiol para valores de potenciais positivos em todos os pHs estudados, conforme mostra a **Tabela 4**. De acordo com os dados obtidos, o aumento de sensibilidade foi mais significativo para o surfactante catiônico BCTA, apresentando uma melhor definição nos voltamogramas e uma maior corrente de pico.

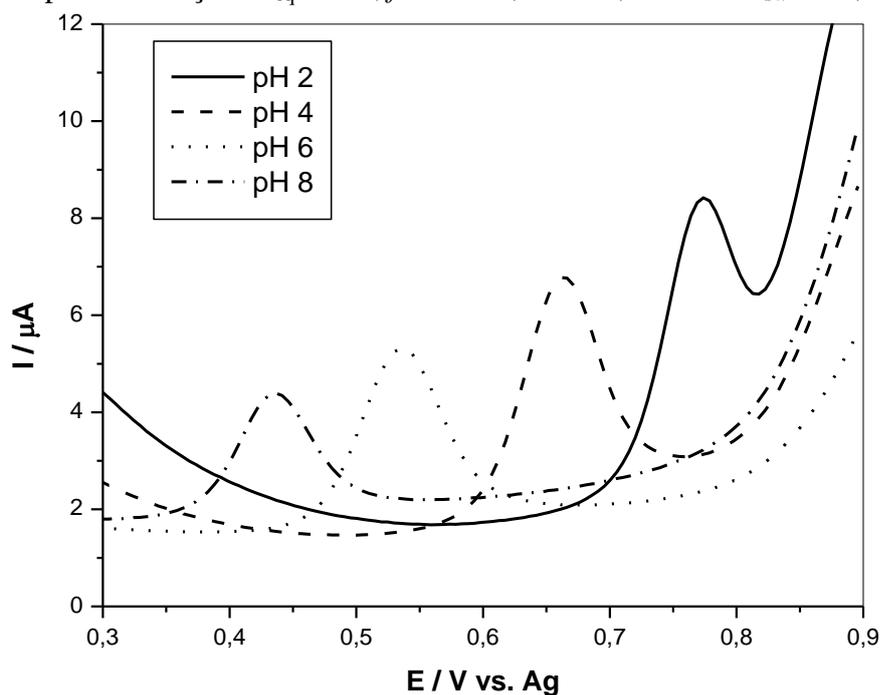
FIGURA 10: Efeito dos surfactantes catiônico, neutro e aniônico. (A) Voltamogramas registrados no pH 4,0. (B) Voltamogramas registrados no pH 6,0. (C) Voltamogramas registrados no pH 8,0.





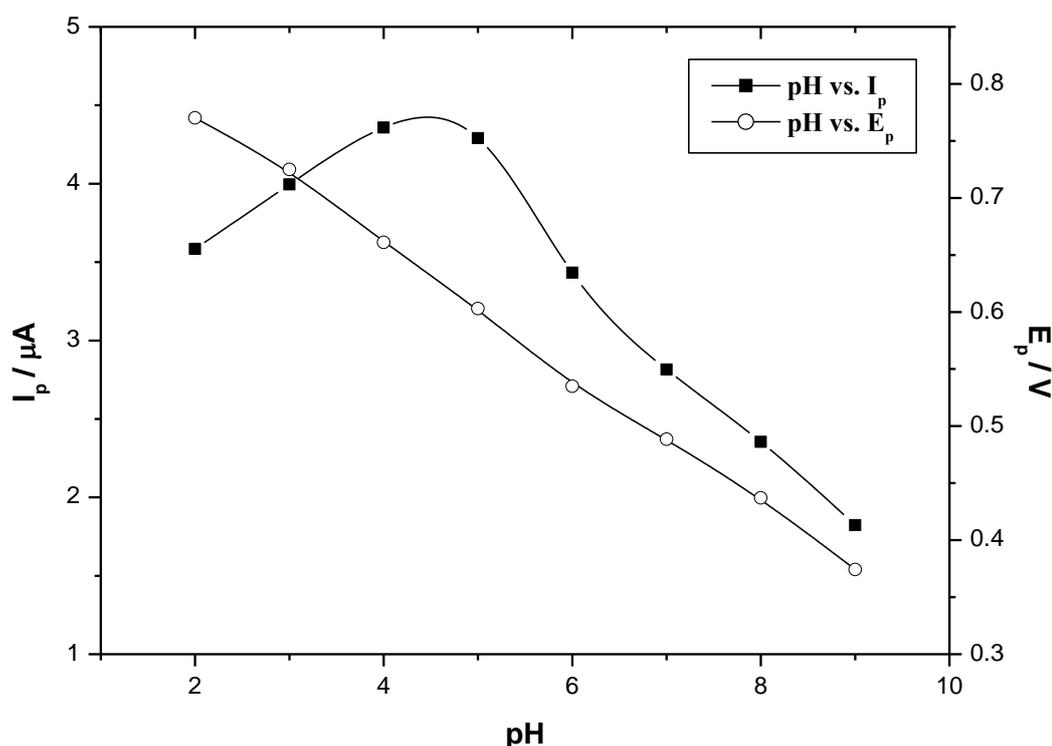
Com objetivo de observar se a presença do BCTA ao eletrólito de suporte prejudicaria o sinal de oxidação do etinilestradiol, foi realizado um estudo de pH na presença de BCTA. A **Figura 11** mostra os voltamogramas de onda quadrada para oxidação do etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pHs, na presença de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de BCTA.

FIGURA 11: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes pHs. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 19,95 \text{ mV}$.



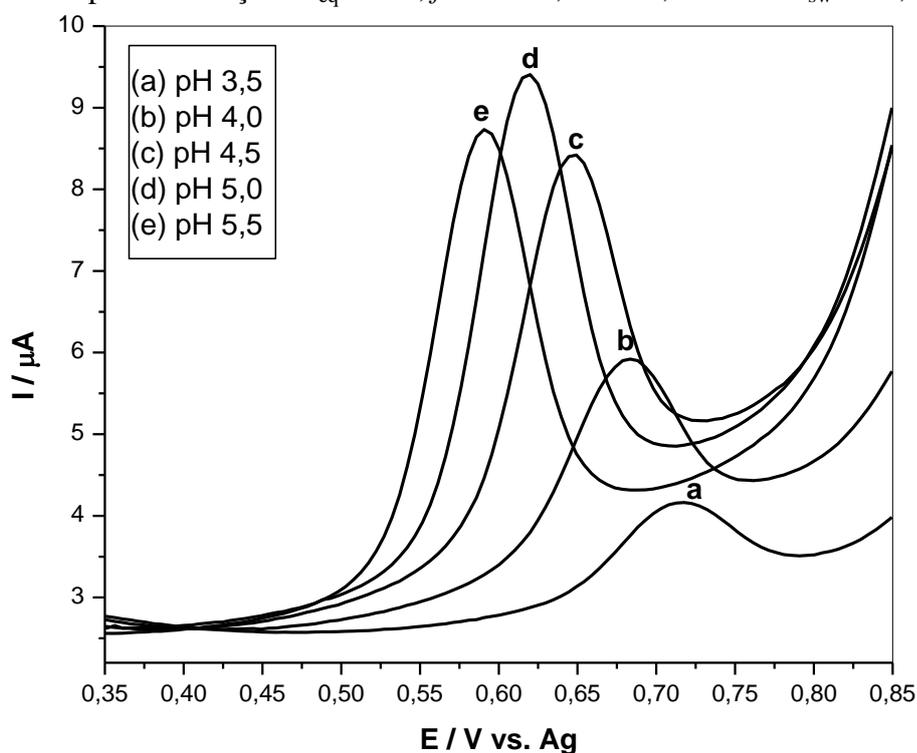
A **Figura 12** refere-se à variação da corrente e potencial de pico de oxidação do hormônio sintético versus o pH do meio na presença de BCTA. Analisando as **Figura 11 e 12** observa-se um comportamento semelhante ao das **Figuras 8 e 9**, no qual, verifica-se que há um máximo de corrente de pico no pH 4,0, e a partir do qual a um decréscimo acentuado na corrente de pico até pH 9,0. Nota-se ainda que o potencial de pico deslocam-se para valores mais negativos com aumento do pH do meio, comportamento similar ao do estudo de pH sem surfactante. Portanto, comparando os estudos de pH na ausência e presença de BCTA pode verificar-se que o estudo na presença do surfactante apresentou uma melhor sensibilidade. Além disso, houve um deslocamento do potencial de pico para valores positivos, este descolamento pode favorecer a aplicação do analito na amostra.

FIGURA 12: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



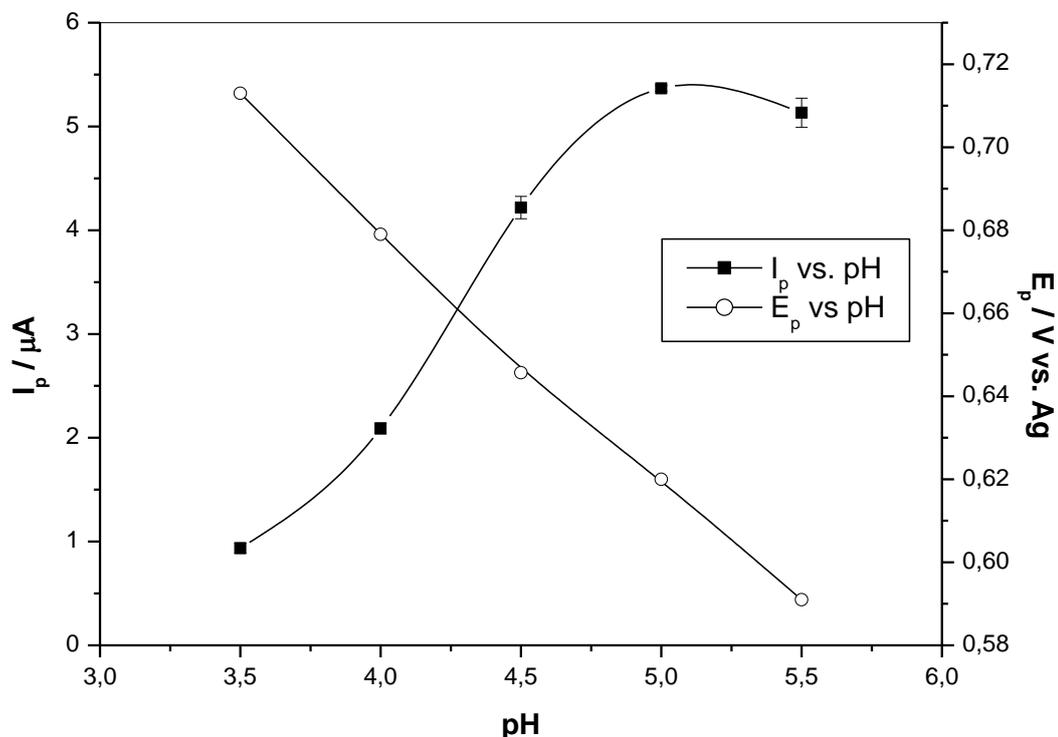
Ambos os estudos apresentaram um máximo de corrente de pico no pH 4,0, afim de ser obter uma melhor resposta para o etinilestradiol, estudou-se a influência de outro eletrólito de suporte, o tampão acetato na presença do surfactante BCTA $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Este eletrólito foi selecionado por abranger a faixa de pH 3,0 a 5,5 no qual foi o intervalo que apresentou maiores correntes de picos. Os voltamogramas deste estudo de pH são apresentados na **Figura 13**.

FIGURA 13: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes pHs. Condições: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 19,95 \text{ mV}$.



Na **Figura 14** é apresentada a variação corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Pode-se observar que as correntes de pico utilizando tampão acetato como eletrólito de suporte foram superiores às apresentadas em meio ao tampão BR. A fim de selecionar o pH ótimo para a oxidação do etinilestradiol, além de verificar a corrente de pico, foi também comparada a definição dos picos obtidos nos dois eletrólitos. Sendo assim, o eletrólito suporte tampão acetato pH 5,0 foi selecionado para dar continuidade nos estudos.

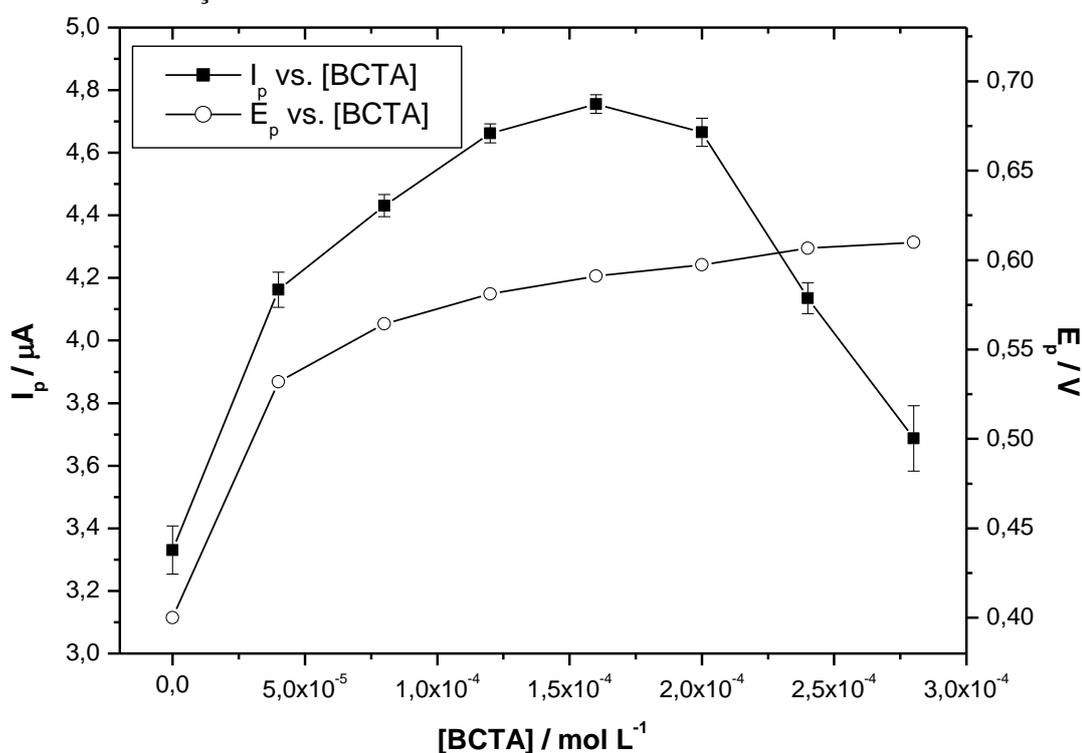
FIGURA 14: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs.



2.3.4 – ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE BCTA

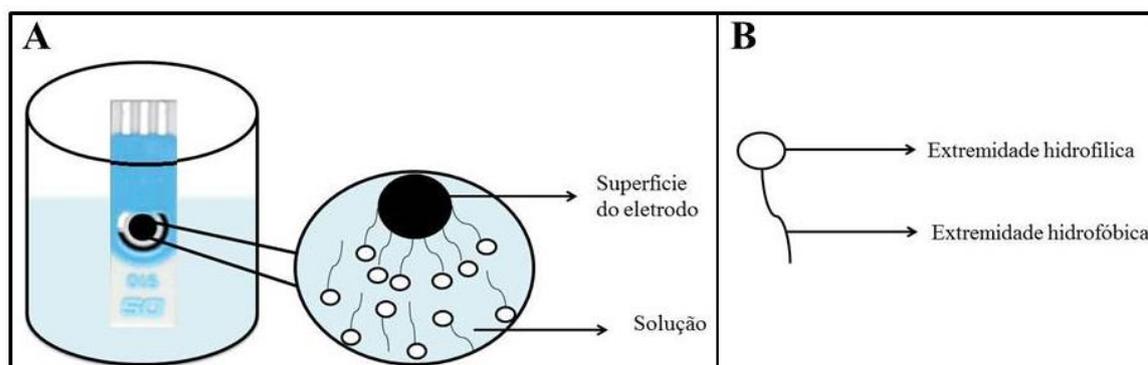
Após a realização de testes que permitiram selecionar o melhor eletrólito e avaliar a influência da adição de surfactantes à célula eletroquímica, realizou-se um estudo variando-se a concentração do surfactante catiônico, BCTA, o qual apresentou melhores resultados nas medidas eletroquímicas de EE2. Foram avaliadas concentrações de BCTA no intervalo de 0 a $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A **Figura 15** apresenta resultados referentes à variação da corrente e do potencial de pico para a oxidação de EE2 em meio de tampão acetato (pH 5,0) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de BCTA.

FIGURA 15: Variação da corrente e do potencial de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato (pH 5,0) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de BCTA.



Na literatura, trabalhos relatam que o surfactante BCTA pode ser adsorvido na superfície do eletrodo, formando-se um filme que modifica o sobrepotencial das reações influenciando na velocidade de transferência de elétrons. A superfície do eletrodo é hidrofóbica, deste modo o BCTA pode adsorver-se no eletrodo por meio de interação hidrofóbica entre a extremidade apolar do BCTA e superfície hidrofóbica do eletrodo, resultando em direcionamento da extremidade hidrofílica para a solução. O BCTA em concentrações inferiores à sua CMC forma uma monocamada (monômeros) compacta com cargas positivas (XIE & YANG, 2007; HUANG, 2004). Neste trabalho, a concentração de BCTA utilizada é inferior à CMC, que de acordo com a literatura, está em torno de $9,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de água (SZYMULA & NARKIEWICZ-MICHALEK, 2006), logo por se tratar de um eletrólito, o valor da CMC na célula é inferior ao valor apresentado para água. Desta forma, a adição de BCTA à célula proporcionou aumento da quantidade de analito adsorvido na superfície do eletrodo e, conseqüentemente, aumentou a corrente de pico e melhorou a estabilidade das medidas. De acordo com a literatura, a orientação do BCTA na interface eletrodo/solução utilizada neste trabalho pode ser representada na **Figura 16**.

FIGURA 16: **A** - Representação esquemática do surfactante BCTA (abaixo da concentração CMC) adsorvido na interface eletrodo-solução. **B** - Molécula de BCTA – extremidade hidrofílica e hidrofóbica.



Observando a **Figura 15** podemos verificar que há um pequeno deslocamento do potencial de pico para valores mais positivo conforme aumenta a concentração do BCTA. Já a corrente de pico teve um aumento até a concentração de $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a partir desta concentração há um decréscimo da corrente. O aumento da corrente de pico esta relacionado com filme concentrado de moléculas de BCTA na forma de monômeros na superfície do eletrodo, este filme permite maior interação com o EE2. O decréscimo da corrente de pico de oxidação do EE2 pode estar ocorrendo devido à formação de micelas na superfície do eletrodo, sendo assim, à diminuição da transferência de elétrons, resultando na diminuição da intensidade de corrente de pico em maiores concentrações de BCTA.

A fim de se obter uma melhor resposta para a detecção de EE2 a concentração de $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi otimizada para o desenvolvimento da metodologia, além de proporcionar uma maior corrente de pico, promoveu uma melhor estabilidade nas medidas eletroquímicas.

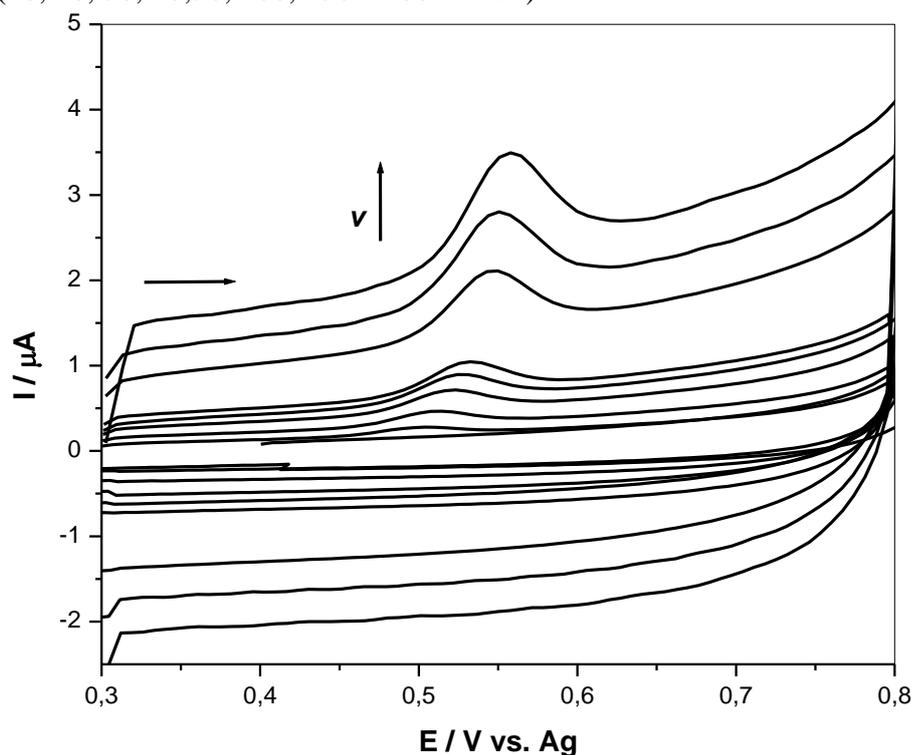
2.3.5 - ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA DE POTENCIAL POR VC

A velocidade de varredura de potencial é um parâmetro eletroquímico muito utilizado em VC para caracterização de processos eletródicos envolvendo desde a reversibilidade das transferências de carga até a estabilidade de produtos intermediários. Desta forma, foi estudado o efeito da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 200 mV s^{-1} para a oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ nos pHs 3, 6 e 9, na presença do surfactante catiônico BCTA ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Os voltamogramas cíclicos obtidos em função da velocidade de varredura para o etinilestradiol na presença de BCTA em meio de tampão BR pH 6 podem ser observados na **Figura 17**. Observando estes voltamogramas podemos visualizar que a corrente de pico

aumenta gradativamente com o aumento da velocidade de varredura, este comportamento foi observado nos pHs 3 e 9. Pode-se verificar também que nos voltamogramas cíclicos há ausência de pico durante a varredura no sentido inverso, portanto este processo indica um comportamento irreversível, este pico irreversível corresponde à oxidação do grupo hidroxila do anel aromático (PAVINATTO, et. al., 2015).

FIGURA 17: Voltamogramas cíclicos para oxidação eletroquímica de etinilestradiol em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6 e BCTA $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varreduras (10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 e 200 mV s^{-1}).



Observando a **Figura 18** verifica-se que o há um pequeno deslocamento do potencial de pico para valores de potenciais positivos, confirmando o comportamento irreversível do processo de oxidação do etinilestradiol.

A intensidade da corrente de pico em função da velocidade de varredura apresentou uma correlação linear para os pHs estudados (**Figura 19**), o que caracteriza um processo eletródico controlado por adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo.

FIGURA 18: Variação do E_p versus ν , para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ nos pHs 3, 6 e 9.

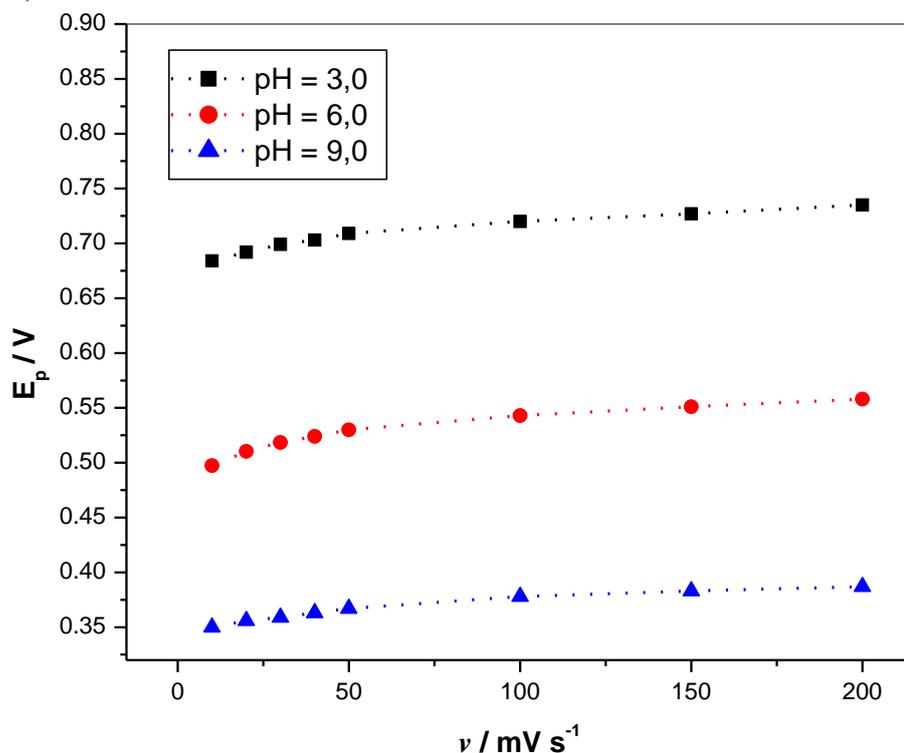
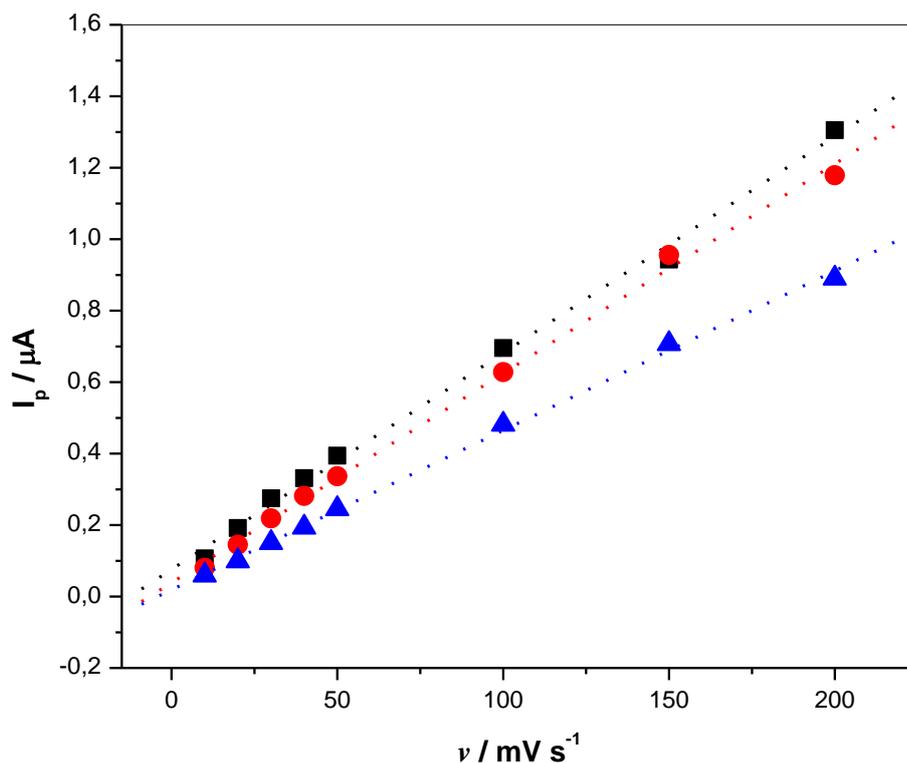


FIGURA 19: Variação da I_p versus ν , para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ nos pHs 3, 6 e 9.



Outra forma de verificar se o transporte de massa na interface eletrodo/solução é de adsorção ou difusão é analisar o coeficiente angular da relação entre logaritmo da intensidade de corrente de pico com logaritmo da velocidade de varredura. Se o coeficiente angular for próximo de 0,5 é esperado que o transporte de massa seja controlado por difusão, se o coeficiente angular for próximo de 1 o transporte de massa é controlada por adsorção das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Valores intermediários sugerem um transporte de massa misto, controlado por difusão e adsorção (BELTAGI, 2003; GHONEIM & TAWFIK, 2004).

A **Figura 20** apresenta a relação entre o $\log I_p$ versus $\log v$, para uma solução de etinilestradiol na presença de BCTA e tampão BR nos pHs 3, 6 e 9. Observando o gráfico pode verificar que houve uma linearidade e os valores de coeficiente angular foram entre 0,8168 a 0,9288 (conforme a **Tabela 5**). Estes valores indicam que o transporte de massa é controlado na maioria por adsorção da espécie etinilestradiol sobre a superfície do eletrodo.

FIGURA 20: Variação do $\log I_p$ versus $\log v$, para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ nos pHs 3, 6 e 9.

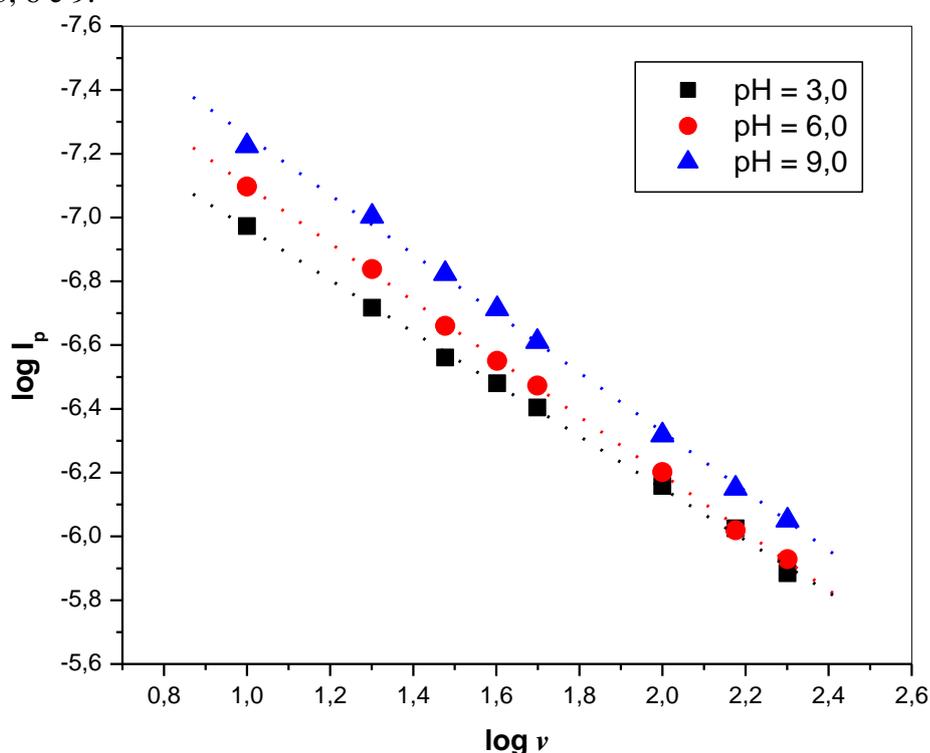


TABELA 5: Valores de coeficiente angular obtidos para a variação de $\log I_p$ versus $\log \nu$.

pH	Coeficiente angular $\Delta \log I_p / \Delta \log \nu$	R (n = 8)
3	0,8168	0,9993
6	0,9065	0,9998
9	0,9288	0,9990

2.3.6 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VOQ

A otimização dos parâmetros para técnica selecionada é de fundamental importância para se obter uma melhor resposta para a intensidade de corrente, melhorando assim a sensibilidade do método. Os parâmetros da VOQ foram estudados variando-se um parâmetro em cada conjunto de experimentos. Os parâmetros otimizados foram frequência de pulso (f), a amplitude de pulso (E_{sw}) e o incremento de varredura (ΔE). Para escolher a melhor condição de trabalho, levou-se em consideração uma boa intensidade de corrente em conjunto com um bom perfil voltamétrico. A **Tabela 6** resume os dados obtidos durante os experimentos realizados nesta etapa.

TABELA 6: Descrição do estudo dos parâmetros de aplicação da VOQ.

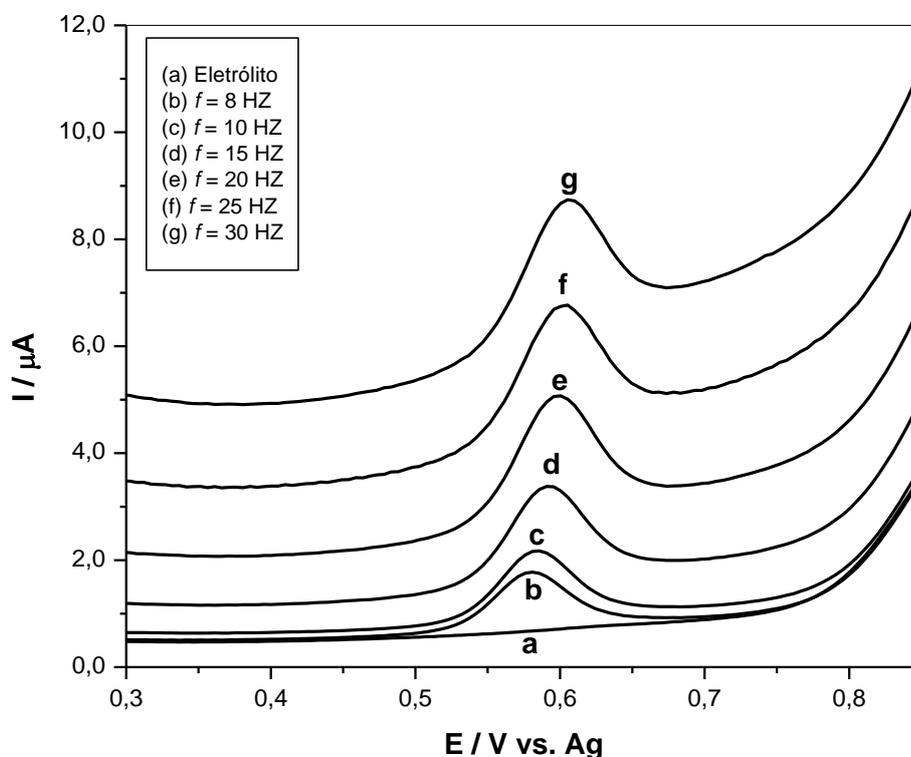
Parâmetro	Faixa Estudada	Valor selecionado
Frequência (Hz)	8-30	20
Amplitude de pulso (mV)	10-50	30
Incremento de varredura (mV)	3-15	7

2.3.6.1 - FREQUÊNCIA DE PULSO

O primeiro parâmetro investigado foi à frequência de pulso, é um dos parâmetros da VOQ mais importante, pois ela influencia na intensidade do sinal e conseqüentemente na sensibilidade do método. Além disso, a frequência está relacionada com a velocidade efetiva da VOQ e as análises possibilitam, ainda, identificar o tipo de processo e o número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica.

O estudo foi realizado no intervalo de 8 a 30 Hz, a **Figura 21** apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para etinilestradiol em função da variação da frequência, os resultados indicam que o aumento no valor da frequência provocou um aumento na intensidade de corrente de pico.

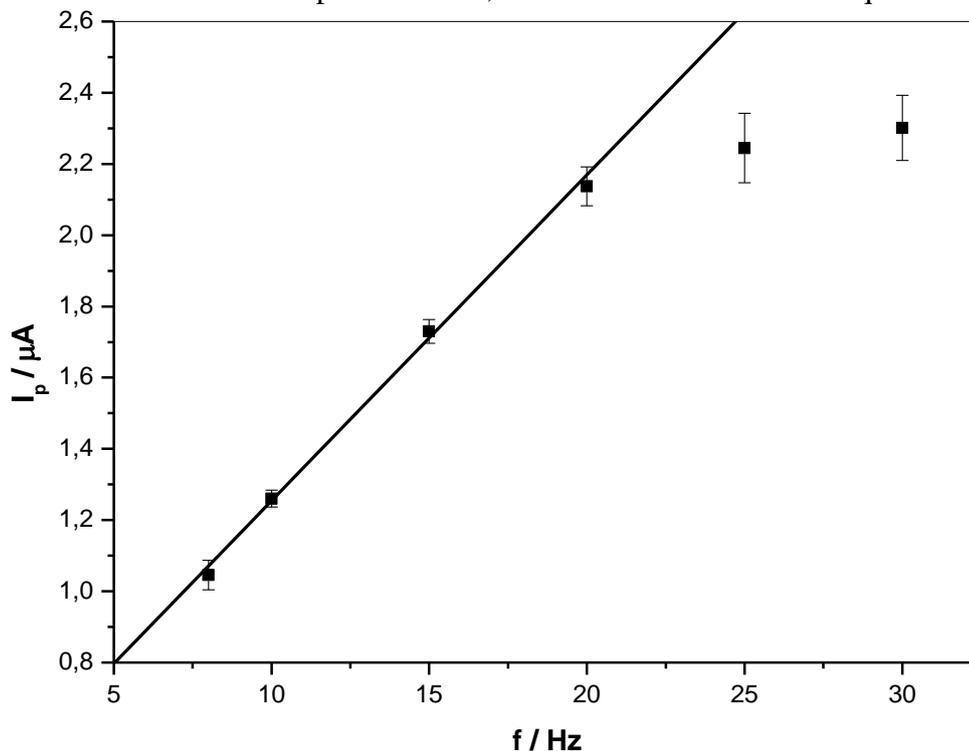
FIGURA 21: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,0) e BCTA $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes frequências. Condições: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$, $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$ e $E_{\text{sw}} = 19,95 \text{ mV}$.



Na VOQ as relações entre a corrente de pico e a frequência ou a raiz quadrada da frequência fornecem informação quanto ao grau de reversibilidade e a existência ou não de processos de adsorção na superfície do eletrodo. O gráfico de corrente de pico em função da frequência (**Figura 22**) apresentou uma correlação linear no intervalo de frequência de 8 a 20 Hz. Para valores de frequência acima de 25 Hz, a corrente de pico tende a estabilizar. De acordo com as teorias aceitas para a VOQ, este comportamento corresponde a um processo irreversível com adsorção do reagente ou reagente e produto das espécies sobre a superfície do eletrodo (LOVRIC, et. al., 1988).

Observando a **Figura 21** os voltamogramas de onda quadrada, nota-se que a corrente residual aumenta com a frequência, assim os resultados do estudo da frequência indicaram que a frequência ótima para oxidação do etinilestradiol é 20 Hz, este valor apresentou uma maior corrente de pico (**Figura 22**).

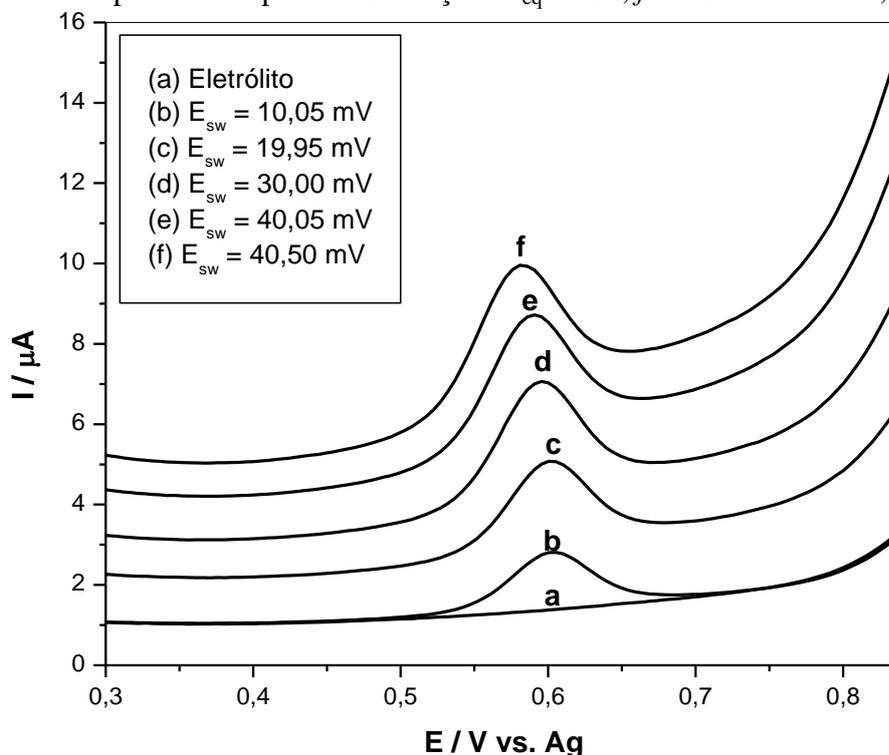
FIGURA 22: Variação da corrente de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes frequências.



2.3.6.2 - AMPLITUDE DE PULSO

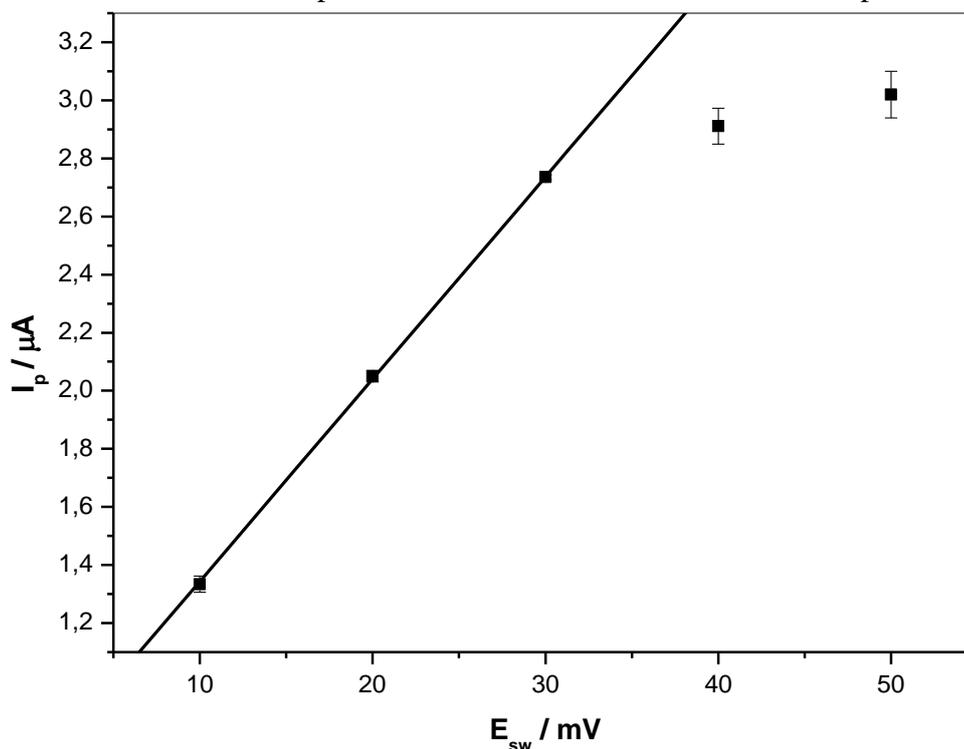
Outra forma de melhorar a sensibilidade analítica da VOQ é variar a amplitude de pulso. Além disso, amplitude também pode ser utilizada para avaliar o processo oxirredução envolvido. No caso de processos redox totalmente irreversíveis, um aumento da amplitude de pulsos, leva a um aumento da sensibilidade, isto porque, para valores de amplitudes maiores que 20 mV, a largura de meia-onda mantém-se praticamente constante. No presente estudo a variação da amplitude foi realizada na faixa de 10 a 50 mV. A **Figura 23** apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a variação da amplitude de pulso para o etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

FIGURA 23: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes amplitudes de pulsos. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$.



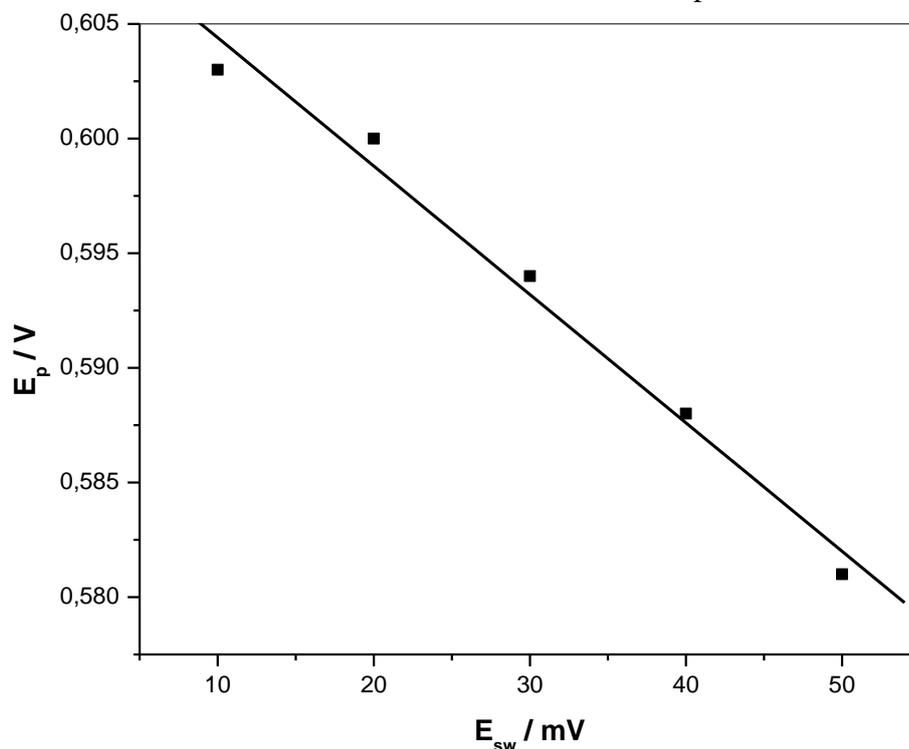
Na **Figura 24** observa-se o gráfico da variação da corrente de pico versus a amplitude de pulso. Pode-se verificar que a corrente de pico aumento linearmente até a amplitude de 30 mV, após este valor o aumento não é mais linear, tendendo a se tornar constante, evidenciando um patamar. Este comportamento está de acordo com a teoria da VOQ, desenvolvida para sistemas totalmente irreversíveis com a espécie adsorvida na superfície do eletrodo, que afirma que para amplitudes acima de 50 mV a corrente de pico é constante (CABRAL, et. al., 2003).

FIGURA 24: Variação da corrente de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes amplitudes de pulsos.



Outro comportamento característico, apresentado para sistemas irreversíveis é o deslocamento do potencial de pico observado com o aumento da amplitude. A **Figura 25** apresenta a variação do potencial de pico com a amplitude de pulso, nota-se que o potencial de pico desloca para valores de potenciais mais negativos, comportamento o qual seria favorável para o desenvolvimento da metodologia, por afastar o pico do etinilestradiol da descarga do eletrodo, o gráfico apresentou a seguinte relação matemática: $E_p (\text{mV}) = 610 + 0,56 E_{sw} (\text{mV})$, com coeficiente de correlação linear de 0,992.

FIGURA 25: Variação do potencial de pico em função da amplitude de pulso para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$.



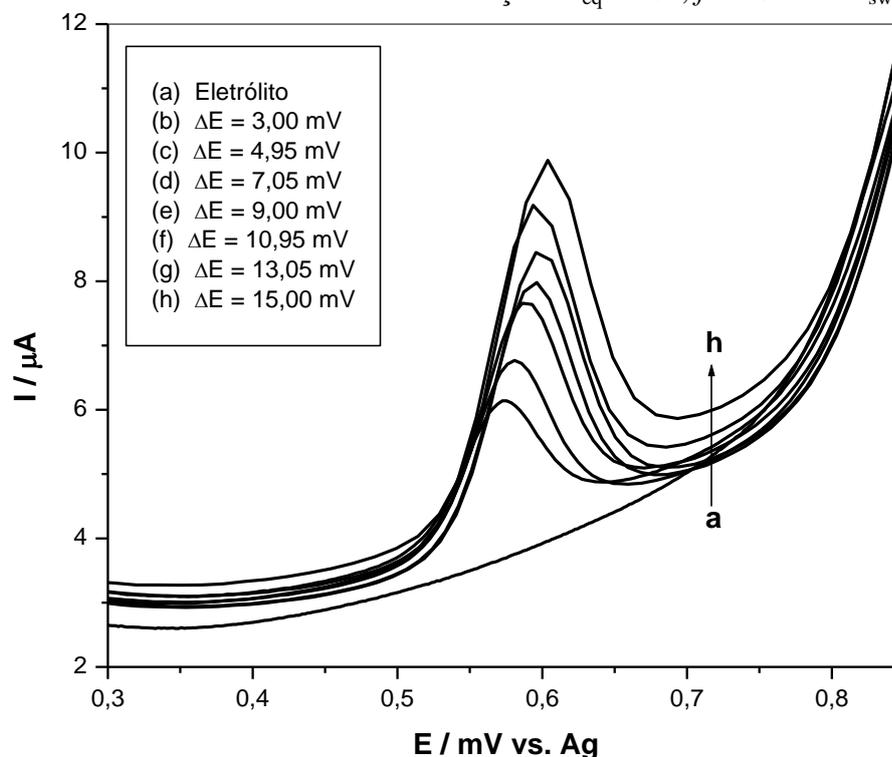
Por fins analíticos a amplitude otimizada para o desenvolvimento da metodologia foi de 30 mV, este valor foi selecionado por exibir: um pico simétrico e definido para o etinilestradiol e a I_p próxima ao valor máximo obtido neste estudo.

2.3.6.3 - INCREMENTO DE VARREDURA

O último parâmetro a ser analisado foi o incremento de varredura que pré-determina o modo pelo qual o potencial é aplicado, considerando como sendo a diferença de altura entre um degrau de potencial e o degrau seguinte, em uma rampa de potenciais na forma de escada, aplicada ao eletrodo de trabalho. O produto entre a f e o ΔE é dada a velocidade efetiva da VOQ, portanto um aumento do incremento de varredura leva a uma melhora na sensibilidade analítica. Porém, com incrementos elevados pode ocorrer um alargamento dos picos, comprometendo sinal obtido (SOUZA, et. al., 2003).

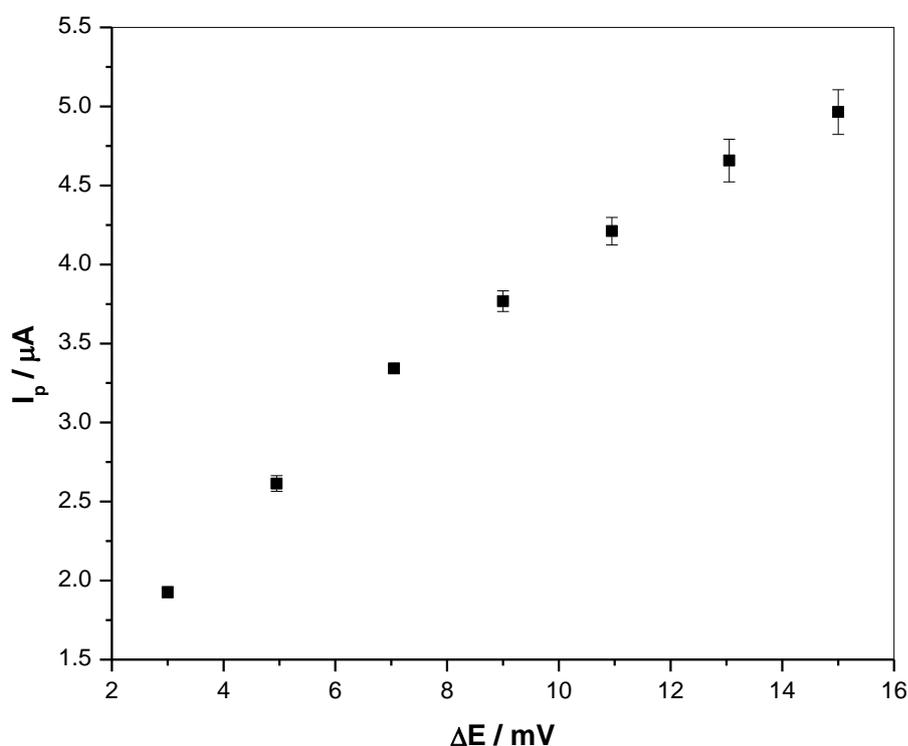
Os valores de incremento de varredura foram investigados no intervalo de 3 a 15 mV. A **Figura 26** apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a variação do incremento de varredura para o etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

FIGURA 26: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e BCTA $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes incrementos de varredura. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$ e $E_{sw} = 30 \text{ mV}$.



Analisando o gráfico da I_p em função ΔE (**Figura 27**), verifica-se um aumento significativo da corrente de pico em todo intervalo estudado, porém em valores de incremento acima de 7 mV ocorre uma perda na resolução do pico, pois menos pontos estão sendo registrados nos voltamogramas a medida que se aumenta os valores de incremento. O ΔE selecionado para o desenvolvimento das análises foi de 7 mV, na qual obteve-se uma melhor relação entre ganho de corrente e sinal obtido.

FIGURA 27: Variação da corrente de pico para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes incrementos de varredura.



2.3.7 - PARÂMETROS OTIMIZADOS

As condições experimentais e instrumentais selecionados para determinação do etinilestradiol através de VOQ são apresentados na **Tabela 7** a seguir. Estes valores serão, posteriormente, utilizados na construção da curva analítica.

TABELA 7: Parâmetros selecionados para análise de etinilestradiol pela técnica de VOQ em EINC - PM.

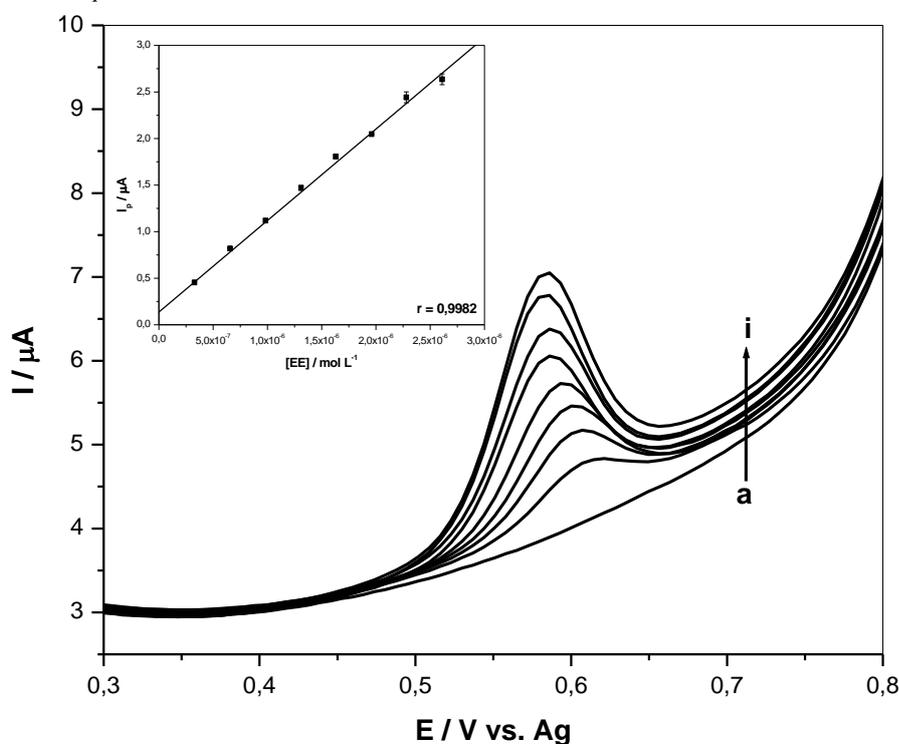
Parâmetros Avaliados	Intervalo Estudado	Parâmetros Otimizados
Eletrólito	Tampão BR e Acetato	Tampão acetato
pH	3,5 - 5,0	5,0
Surfactante	BCTA – Triton x-100 –DSS	BCTA
M_{BCTA}	$0 - 2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Frequência	8 - 30 Hz	20 Hz
Amplitude	0 - 50 Mv	30 mV
Incremento	3 - 15 mV	7,05 mV

2.3.8 - CURVA ANALÍTICA

Utilizando-se a técnica de VOQ e as melhores condições de trabalho para monitorar a oxidação do etinilestradiol, curvas analíticas foram construídas na presença e ausência da matriz (amostra de urina) no intervalo de concentração de $3,3 \times 10^{-7}$ a $2,6 \times 10^{-6}$ mol L, sendo que cada ponto da curva representa a média de três medidas experimentais.

A **Figura 28** apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos após a adição de volumes sucessivos na célula eletroquímica de solução contendo etinilestradiol em meio ao eletrólito de suporte tampão acetato ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,0, na presença de $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de surfactante BCTA. A partir dos valores de corrente de pico obtidos por meio dos voltamogramas, foram construídas as curvas analíticas, as quais foram obtidas em triplicadas. Uma das curvas analíticas é apresentada na **Figura 28**. Observa-se que a intensidade de corrente de pico aumenta linearmente com o aumento da concentração. Os parâmetros obtidos das curvas analíticas na ausência da matriz foram extraídos e estão resumidos na **Tabela 8**.

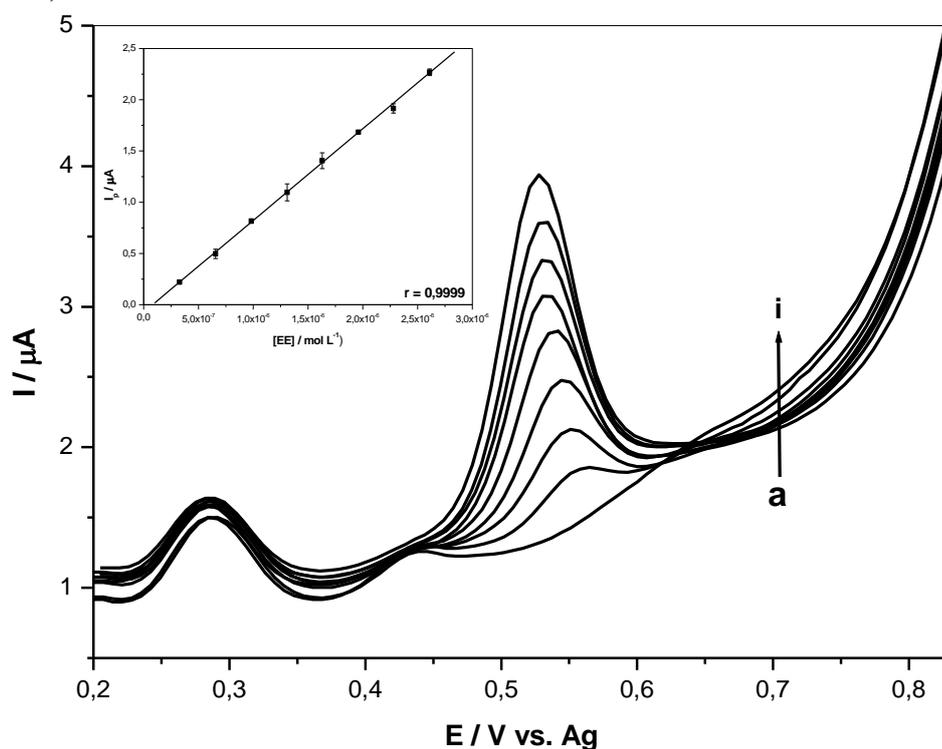
FIGURA 28: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) para: (a) Eletrólito de suporte, (b-i) $(0,33-2,6) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de EE2. **Inserção:** Variação da corrente pico em função da concentração de EE2. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E = 7,05 \text{ mV}$.



Na **Figura 29** são apresentados os voltamogramas e a curva analítica na presença da amostra de urina livre etinilestradiol em tampão acetato ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,0, na presença de

$1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de BCTA. Através dos voltamogramas podemos verificar que na amostra de urina apresenta sinais, embora não sejam interferentes para a determinação de etinilestradiol em urina. Na **Tabela 8** apresenta os parâmetros obtidos das curvas analíticas na presença da matriz.

FIGURA 29: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão acetato 0,04 mol L⁻¹, contendo 40uL de urina isento de etinilestradiol na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b-i) $(0,33-2,6) \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de EE2. **Inserção:** Variação da corrente pico em função da concentração de EE2. Condições: $t_{eq} = 15s$, $f = 20$ Hz, $E_{sw} = 30$ mV e $\Delta E = 7,05$ mV.



De acordo com os dados obtidos a partir das curvas analíticas foi possível determinar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o etinilestradiol. O LD e LQ foram cálculos através do método de extrapolação da curva analítica pelas seguintes equações:

$$LD = 3 \times \frac{Sa}{b} \quad LQ = 10 \times \frac{Sa}{b} \quad \text{Equação 1}$$

Onde Sa é o erro do coeficiente linear da curva analítica e b é o coeficiente angular. O valor de Sa foi calculado a partir dos parâmetros da curva analítica e permite registrar um sinal analítico significativamente diferente do ruído da linha base e próximo dos pontos iniciais da curva analítica com maior confiabilidade (SHRIVASTAVA & GUPTA, 2011; JUNIOR, et.

al., 2001).

TABELA 8: Parâmetros quantitativos obtidos a partir das curvas analíticas na presença e ausência da matriz na análise de etinilestradiol por VOQ em EINC - PM na presença de BCTA.

Parâmetros Avaliados	Ausência da matriz	Presença da matriz
Intervalo de concentração (mol L ⁻¹)	(0,33-2,6)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	(0,33-2,6)x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹
Coeficiente linear (A)*	2,44x10 ⁻⁷	7,27x10 ⁻⁸
Coeficiente angular (A L mol ⁻¹)*	1,11	0,89
Coeficiente de correlação (r)*	0,9982	0,9999
LD (mol L ⁻¹)	2,68x10 ⁻⁸	2,14x10 ⁻⁸
LQ (mol L ⁻¹)	8,92x10 ⁻⁸	7,14x10 ⁻⁸

*Média de três curvas analíticas.

Através dos resultados encontrados na **Tabela 8**, podemos verificar que para ambas as curvas analíticas os limites de detecção e quantificação foram bastante satisfatórios e dentro do esperado.

2.3.9 – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS DE URINA E MEDICAMENTO

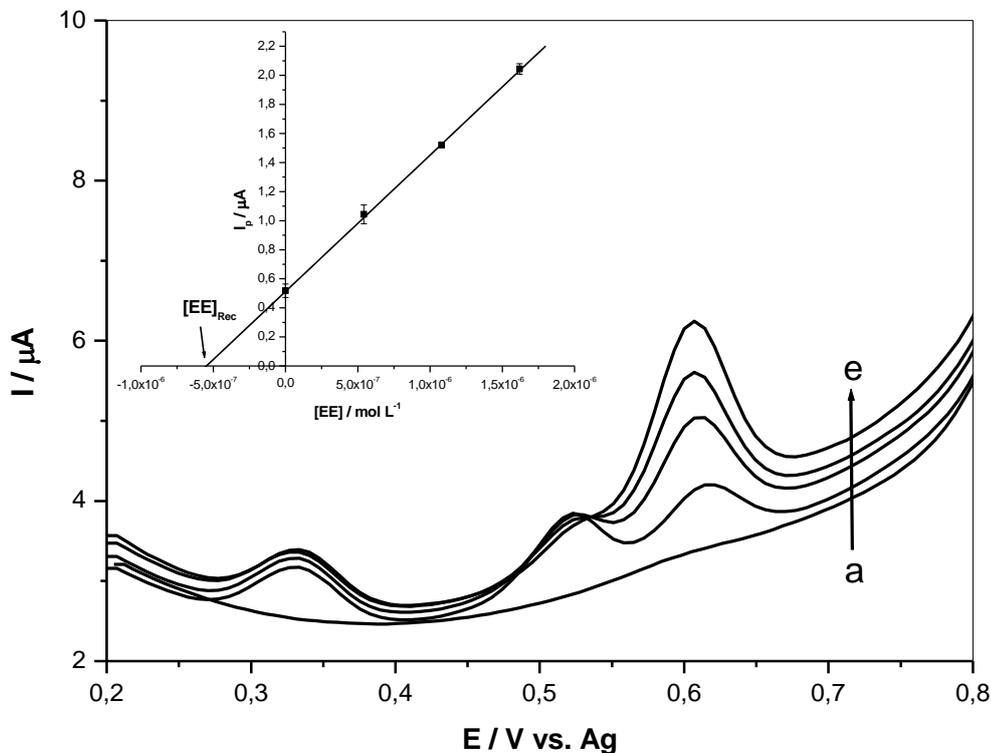
Para verificar a eficiência da metodologia eletroanalítica desenvolvida para determinação de etinilestradiol, foram realizados testes de recuperações pelo método de adição padrão. As amostras utilizadas para estas análises foram urina e medicamentos (amostra A e B) contendo 0,03mg etinilestradiol.

As amostras de urina foram preparadas conforme descrito no item 2.1.4.2. As amostras foram fortificadas com o hormônio EE2 na concentração de 10, 40 e 80mg L⁻¹, estas amostras foram adicionadas na célula eletroquímica, contendo 10mL de eletrólito de suporte, posteriormente foram efetuadas mais quatro adições de solução estoque de etinilestradiol.

A **Figura 30** apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a curva de recuperação obtida para a determinação do hormônio sintético EE2. Através da **Figura 30 (voltamograma b)** pode-se verificar que não há nenhum efeito da matriz que poderia interferir no sinal analítico para a determinação do EE2, por mais que na urina tenha sido observado dois picos de oxidação antes do pico referente ao do EE2.

As curvas de recuperação apresentadas na **Figura 30** (inserção) foram realizadas em triplicata. As curvas apresentaram coeficientes de correlação adequados próximos de 0,999, mostrando a seletividade do método.

FIGURA 30: Voltamogramas onda quadrada registrados em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra de urina fortificada com EE2 ($40,4 \text{ mg L}^{-1}$), (c-e) adições sucessivas da solução padrão do EE2. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E = 7,05 \text{ mV}$.



Os resultados de recuperação obtidos por meio da aplicação da metodologia desenvolvida são apresentados na **Tabela 9**, pode-se observar que os valores obtidos experimentalmente estão de acordo com o esperado, onde as recuperações variaram de 95,8% a 106,4%, e os valores de desvio padrão relativo entre 1,08% a 2,88%. Por meio destes resultados aponta-se que a metodologia desenvolvida pode ser utilizada para a determinação EE2 em amostra de urina sem etapas de pré-tratamento, pois não foi observado nenhum efeito de matriz.

TABELA 9: Resultados das curvas de recuperação obtidas para amostra de urina fortificada com o hormônio sintético EE2.

Urina fortificada [EE2 _{adicionado}]/ mg L ⁻¹	[EE2 _{recuperado}] / mg L ⁻¹	Recuperação / %	Média ¹ / %	DPR ² / %
10,1	9,68	95,8	97,3±1,41	1,45
	9,96	98,6		
	9,85	97,5		
40,4	40,8	101,0	100,0±1,01	1,01
	40,0	99,0		
	40,5	100,2		
80,9	81,7	101,0	104,0±3,00	2,88
	86,1	106,4		
	85,8	106,0		

¹ Média das recuperações e desvio padrão obtidos

² Desvio padrão relativo

A metodologia proposta também foi empregada para determinação do hormônio EE2 em amostras de medicamentos (anticoncepcionais). As amostras de medicamentos, A e B, contendo o hormônio de interesse foram analisadas utilizando o método de adição de padrão, os resultados foram comparados com os valores rotulado na embalagem (0,03mg de etinilestradiol por comprimido).

As **Figuras 31 e 32** apresentam os voltamogramas de onda quadrada e as curvas de recuperação obtidas para a determinação de EE2 em amostra A e B, respectivamente. Analisando estas figuras observa-se uma relação linear entre corrente de pico e aumento da concentração de EE2, com coeficientes de correlação bons próximos de 0,999.

Os dados obtidos para todas as análises realizadas são apresentados na **Tabela 10**. Conforme pode ser constatada a quantidade de EE2 encontrada pela metodologia estão bem próximos dos valores fornecidos no rótulo do produto, demonstrando que os excipientes das formulações farmacêuticas não interferiram nas análises de quantificação.

FIGURA 31: Voltamogramas onda quadrada registrados em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra A, (c-e) adições sucessivas da solução padrão do EE2. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E = 7,05 \text{ mV}$.

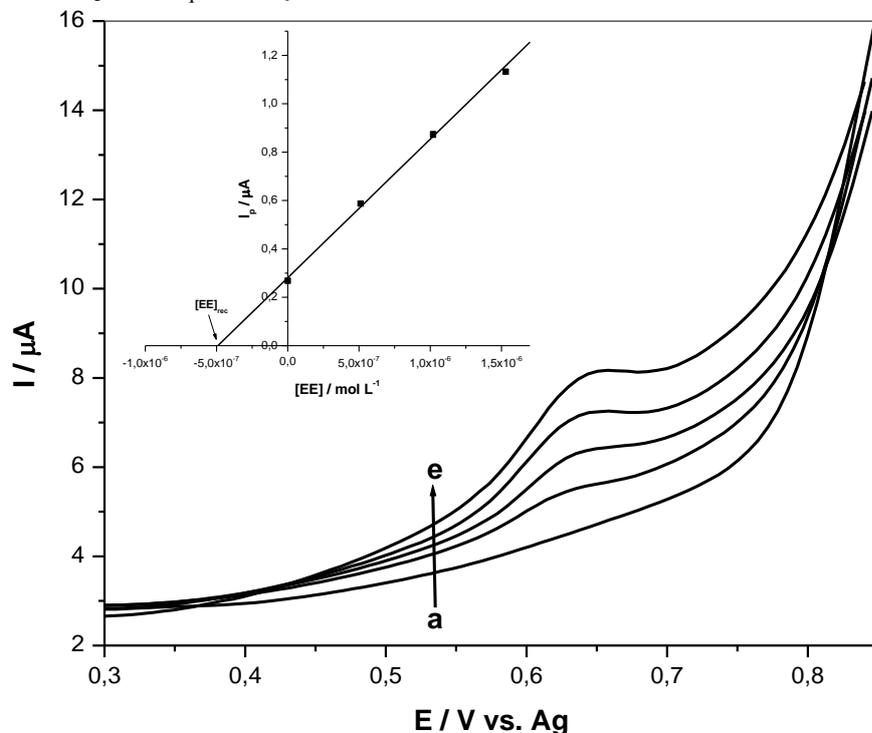


FIGURA 32: Voltamogramas onda quadrada registrados em meio de tampão acetato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, na presença de BCTA ($1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra de B, (c-e) adições sucessivas da solução padrão do EE2. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E = 7,05 \text{ mV}$.

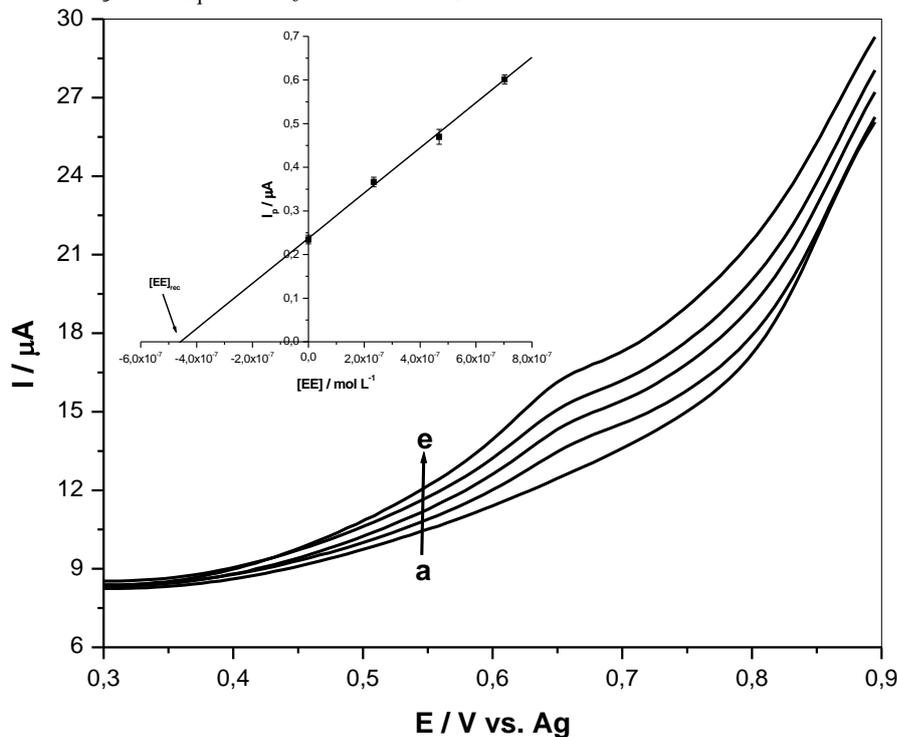


TABELA 10: Resultados dos valores encontrados de EE2 para amostras de medicamentos A e B.

Medicamentos	Valor no rotulo de EE2 / mg por comprimido	Encontrado de EE2 / mg por comprimido	Média ¹ / %	RPR ² / %
Amostra A	0,03	0,0296	0,0298±0,0011	3,69
		0,0289		
		0,0310		
Amostra B	0,03	0,0293	0,0307±0,0012	3,91
		0,0313		
		0,0315		

¹ Média dos valores encontrados e desvio padrão obtidos

² Desvio padrão relativo

Por meio dos resultados obtidos e apresentados nas **Tabelas 9 e 10**, podemos observar que os valores de recuperação para a amostra de urina variaram de 95,08% a 106,4% e os valores encontrados de EE2 nas amostras de medicamentos foram bastante satisfatórios, indicam que no método proposto obteve-se uma boa exatidão. Além disso, os valores de desvio padrão variaram entre 1,01% a 3,91% estabelecendo uma boa precisão. Desta forma, a metodologia desenvolvida pode ser empregada com sucesso na determinação de EE2 em amostras de medicamentos e urina, sem a utilização de nenhuma etapa de pré-tratamento, apresentando sensibilidade, eficiência e rapidez na determinação deste hormônio.

CAPÍTULO III: Determinação simultânea de etinilestradiol e acetato de ciproterona

3.1 - REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo apresentam-se uma breve introdução sobre o material eletródico utilizado (eletrodo sólido de amálgama), o procedimento, os resultados e discussão dos resultados obtidos para a determinação eletroanalítica simultânea dos hormônios sintéticos etinilestradiol e acetato de ciproterona utilizados na fabricação de anticoncepcionais, utilizando-se a técnica voltametria de varredura linear e diferentes tipos de surfactantes.

3.1.1 - ELETRODOS DE AMÁLGAMA

A utilização do metal mercúrio tanto como eletrodo ou em qualquer outra ocasião tem sido uma grande preocupação aos pesquisadores, devida a sua elevada toxicidade, em alguns países o uso do mercúrio para fins eletroanalíticos está sendo proibido. Por esta razão, existe um grande interesse na busca de materiais alternativos ao mercúrio, mas que apresentem todas as vantagens destes eletrodos juntamente com a possibilidade de monitoramento on-line de poluentes orgânicos, e aliados ao conceito de materiais ambientalmente seguros, os quais são compatíveis com a aplicação da Química Verde (SOUZA et al., 2011).

Os eletrodos de amálgama são definidos como eletrodos compostos por uma liga contendo mercúrio e um ou mais metais, podem ser líquido, pastoso ou sólido. Os metais mais comumente empregados para a preparação de eletrodos de amálgama são cobre, prata, ouro, irídio, platina, cádmio, bismuto, onde a escolha adequada do metal a ser utilizado está diretamente relacionada ao tipo de analito de interesse. Uma das principais vantagens deste eletrodo é a estabilidade mecânica, que possibilita seu emprego em análises de sistemas em fluxo. Além disso, esses eletrodos não são tóxicos, possuem um amplo intervalo de potencial, elevada razão sinal-ruído e, principalmente, resistência a processos de passivação da superfície eletródica, o uso deste eletrodo vem sendo um dos grandes desafios para os pesquisadores das áreas de eletroquímicas e eletroanalíticas em todo o mundo (YOSYPCHUK & NOVOTNY, 2002; SOUZA et al., 2011; BARBOSA et al., 2012)

O uso de eletrodo sólido de amálgama (ESA) teve um crescimento intenso a partir de 2000, nas áreas de eletroquímica e eletroanalítica graças aos trabalhos desenvolvidos por dois grupos independentes de pesquisa, um na República Tcheca e outro na Noruega. Os ESA desenvolvidos por estes dois grupos de pesquisa apresentam propriedades eletroquímicas desejáveis e com reprodutibilidade em um nível aceitável para aplicações analíticas. Enquanto

o grupo norueguês desenvolve ESA baseados em amálgamas dentárias para aplicações na análise de metais, o grupo tcheco se dedica ao desenvolvimento de ESA utilizando uma grande variedade de metais (prata, cobre, ouro e tálio) e a modificação destes eletrodos com filme ou menisco de mercúrio (YOSYPCHUK & NOVOTNY, 2002; MIKKELSEN & SCHRODER, 2003; YOSYPCHUK & SESTÁKOVÁ, 2008).

3.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 - REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau analítico e a água utilizada foi ultrapura (resistividade 18.2 MΩ cm) obtida por um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore).

As soluções dos padrões etinilestradiol e de acetato de ciproterona ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foram obtidos da Sigma ALdrich, ambos os compostos foram preparados pela dissolução da massa apropriadas em 10 mL de etanol (99.6%, Dinamica). As soluções foram transferidas para frasco de cor âmbar e estocadas sob refrigeração até sua utilização.

Para realizar a medidas voltamétricas foram utilizados como eletrólito de suporte tampão Britton-Robbinson (BR) que foi preparada pela mistura dos ácido acético (Merck), ácido bórico (Merck) e ácido fosfórico (Merck), todos com concentração de 0,04 mol L⁻¹, o pH foi ajustado com hidróxido de sódio (Merck) 1,0 mol L⁻¹.

Foram preparas soluções com os surfactantes: neutro, triton X-100 (TX-100, Acros Organics), aniônico, dodecil sulfato de sódio (DSS, Sigma) e o catiônico, brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA, SERVA). Estas soluções foram preparadas pela dissolução em água ultrapura.

As amostras de medicamentos utilizadas para a determinação simultânea de AC e EE2 foram obtidas em farmácias situadas na cidade de Campo Grande – MS. As amostras de urina foram coletadas de indivíduos isento dos hormônios, a coleta foi realizada segundo as normas da ANVISA.

3.2.2 - EQUIPAMENTOS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo GPSTAT 128N (Eco Chemie), interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9 (Eco Chemie) para aquisição dos dados.

Foram utilizados um pHmetro digital (TecnoPON/modelo MPA-20), juntamente com um agitador magnético TM 125 Shott para o ajuste do pH das soluções eletrolíticas.

As adições de volumes na célula eletroquímica e as diluições das soluções foram realizadas com o auxílio de micropipetas HTL Série LABMATE, com capacidade de 2 a 20 μL , 20 a 200 μL e de 100 a 1000 μL .

Utilizou-se uma balança Sartorius R160 para realizar todas as pesagens.

Na preparação das amostras foram utilizados banho ultrassom UNIQUE modelo USC-1800A e uma centrífuga da Sigma Laborzentrifugen (Modelo no 94199-2002, Germany) para separação do sobrenadante.

Os eletrodos utilizados para realizar as medidas simultânea foram eletrodo sólido de amálgama de prata como eletrodo de trabalho, eletrodo de Ag/AgCl 3 mol L^{-1} como eletrodo de referência e como contra eletrodo um fio de platina.

3.2.3 - EXPERIMENTOS VOLTAMÉTRICOS

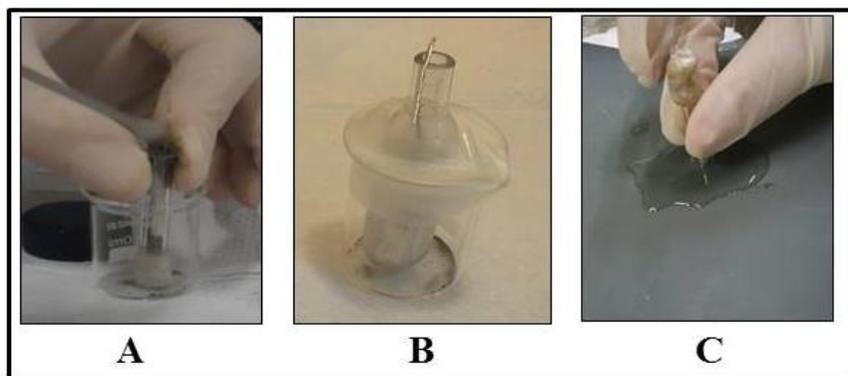
As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula contendo 10 mL do eletrólito de suporte. A solução do eletrólito de suporte foi desaerada por 10 minutos com nitrogênio puro, este procedimento foi adotado para minimizar a presença de oxigênio em solução. A fim de registrar todos os voltamogramas, alíquotas apropriadas de solução estoque dos hormônios EE2 e AC e de surfactantes foram diluídas em 10,0 ml de solução do eletrólito de suporte no pH desejado. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente.

3.2.4 - PREPARO DO ELETRODO SÓLIDO DE AMÁLGAMA DE PRATA

A construção do ESA Ag foi realizado de modo semelhante ao descrito na literatura (YOSYPCHUK & NOVOTNY, 2002; DANTAS, et. al., 2010; YOSYPCHUK, et. al., 2012; BARBOSA, et. al., 2012; JESUS, et.al., 2017). Primeiramente, fez-se o empacotamento de nano pó de prata em um capilar de vidro fino, utilizou-se um fio de platina como contato elétrico (**Figura 33A**), após o empacotamento o material foi imerso em recipiente contendo mercúrio líquido, onde permaneceu em repouso por 3 dias (**Figura 33B**), este procedimento foi realizado para que a amálgama de prata fosse obtida. Para a finalização do processo de amálgamação o eletrodo foi retirado do mercúrio, permanecendo em repouso por 03 dias. Em seguida, fez-se um polimento do disco sólido amalgamado com auxílio de uma lixa d' água

2000 (**Figura 33C**). Para a ativação do ESA Ag foi utilizado uma solução de KCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando um potencial de $-2,2 \text{ V}$ durante 300 segundos (JESUS, et. al., 2017).

FIGURA 33: Processo de fabricação eletrodo de amalgama. (A) Empacotamento de nano pó de prata e fio de platina (contato elétrico). (B) Processo de amalgamação. (C) Polimento disco sólido amalgamado.



3.2.5 - PREPARO DAS AMOSTRAS

3.2.5.1 - AMOSTRA DE MEDICAMENTO

A amostra de medicamento utilizada para a determinação simultânea de EE2 e AC foi o anticoncepcional – amostra C, contendo $0,35\text{mg}$ de EE2 e 2mg de AC por comprimidos. Primeiramente pesou-se a massa de 10 comprimidos triturados em um tubo de ensaio, adicionou-se 3 mL de etanol. Após, a mistura foi levada para o ultrassom durante 5 minutos, a seguir o material foi separado por centrifugação durante cerca de 5 minutos a 4000rpm . A camada sobrenadante foi filtrada com o auxílio de uma seringa e filtro $0,45\mu\text{m}$ em um balão volumétrico, este procedimento foi repetido 3 vezes, em seguida completou-se o balão volumétrico com etanol. Esta solução foi submetida à análise eletroanalítica simultânea e a quantificação de EE2 e AC na amostra de medicamento, realizada pelo método de adição de padrão. O esquema da **Figura 5** (página 18) ilustra o procedimento realizado para o preparo da amostra.

3.2.5.2 - AMOSTRA DE URINA

As amostras de urina isentas dos hormônios analisados foram coletadas em frascos de vidro e armazenadas sob refrigeração. As amostras de urina foram transferidas para balões volumétricos de 10mL e foram fortificadas com etinilestradiol e acetato de ciproterona nas concentrações de $6,5\text{mg L}^{-1}$ e $8,4\text{mg L}^{-1}$, respectivamente, estes níveis de fortificação foram

selecionados a partir dos resultados obtidos por meio da curva analítica, primeiramente foi adicionada a amostra fortificada na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito de suporte e surfactante BCTA $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em seguida foram efetuadas adições de solução estoque de EE2 e AC.

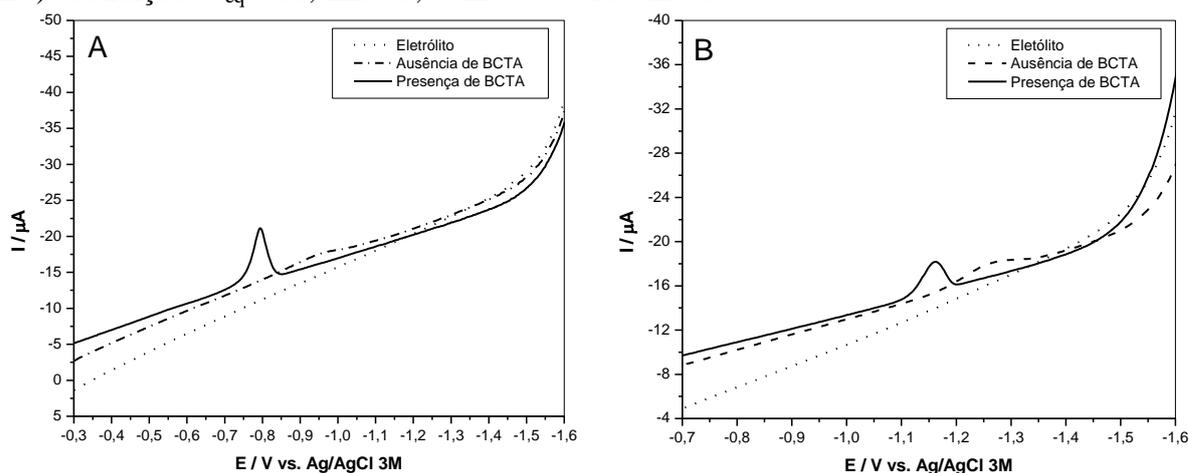
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 - ESTUDOS INICIAIS

Inicialmente foi realizado um estudo individual para verificar se a presença de surfactante proporcionaria a melhora da resposta eletroquímica dos hormônios EE2 e AC. Os surfactantes utilizados foram: catiônico (BCTA), aniônico (DSS) e neutro (Triton X-100).

Os resultados da resposta eletroquímica para os dois hormônios na presença de BCTA são apresentados na **Figura 34**. Podemos verificar que para ambos os hormônios, na presença do surfactante BCTA houve um aumento significativo da corrente e apresentou um melhor perfil voltamétrico.

FIGURA 34: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B) em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, na presença e na ausência do surfactante catiônico BCTA ($1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Condições: $t_{eq} = 5s$, $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$ e $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.



Na **Figura 35** mostram os resultados na presença do surfactante Triton X-100 para os dois hormônios. Observando a **Figura 35A** podemos verificar que houve um pequeno aumento na corrente de pico e um descolamento do potencial de pico para valores mais negativos na redução do EE2. Enquanto na **Figura 35B** a corrente de pico da redução do AC

não sofreu alteração e o potencial de pico deslocou-se para valores mais positivos. Por meio dos voltamogramas apresentados na **Figura 35**, é possível observar que à presença do surfactante Triton X-100 não permite à determinação simultânea do EE2 e AC, pois os potenciais de picos para redução dos analitos são próximos e deste modo se sobrepõem, impossibilitando a determinação simultânea, como observado na **Figura 36**.

FIGURA 35: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B) em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, na presença e na ausência do surfactante neutro Triton X-100 ($1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Condições: $t_{eq} = 5\text{s}$, $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$ e $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.

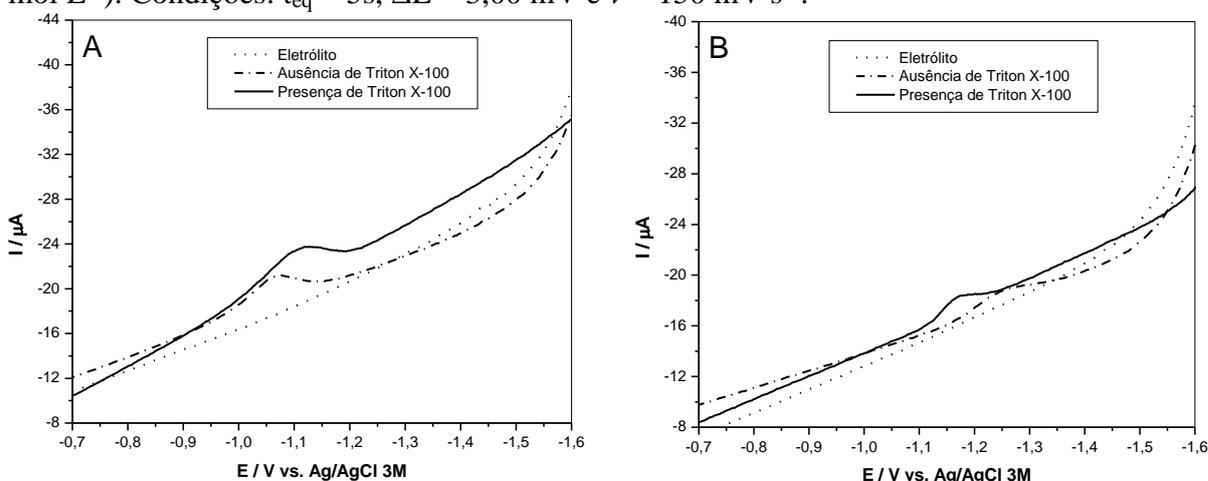
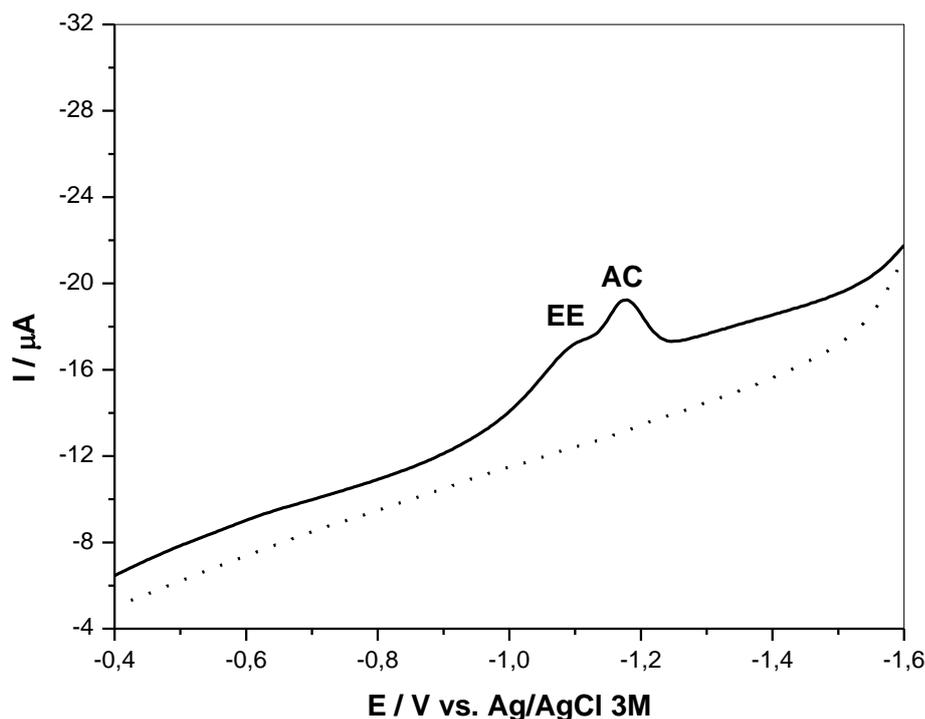
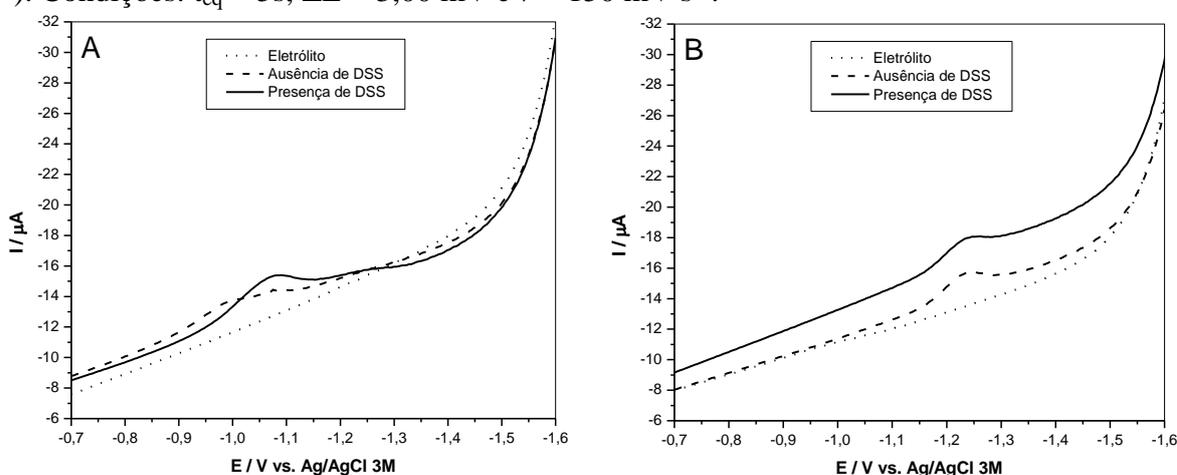


FIGURA 36: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol e acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, na presença do surfactante neutro Triton X-100 ($1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Condições: $t_{eq} = 5\text{s}$, $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$ e $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.



Os resultados para ambos os hormônios na presença do surfactante DSS são mostrados na **Figura 37**. Podemos verificar que para o hormônio EE2 na presença de DSS (**Figura 37A**) houve um pequeno aumento da corrente de pico e um deslocamento do potencial para valores negativos, este deslocamento poderia interferir na determinação simultânea. Contudo o hormônio AC na presença do DSS (**Figura 37B**) não proporcionou uma melhora na resposta eletroquímica, além disso, houve um aumento na corrente residual.

FIGURA 37: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (**A**) e de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (**B**) em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, na presença e na ausência do surfactante aniônico DSS ($1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Condições: $t_{eq} = 5 \text{ s}$, $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$ e $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.



Visto que a presença de surfactante BCTA promoveu a melhora na detecção dos dois hormônios sintéticos EE2 e AC, realizou-se um estudo individual para verificar qual seria a melhor concentração de BCTA. Nas **Figuras 38 e 39** mostram os resultados destes estudos para ambos os hormônios.

FIGURA 38: (A) Variação da corrente e potencial de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 em diferentes concentrações de BCTA. Condições: $t_{\text{eq}} = 5\text{s}$, $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$ e $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.

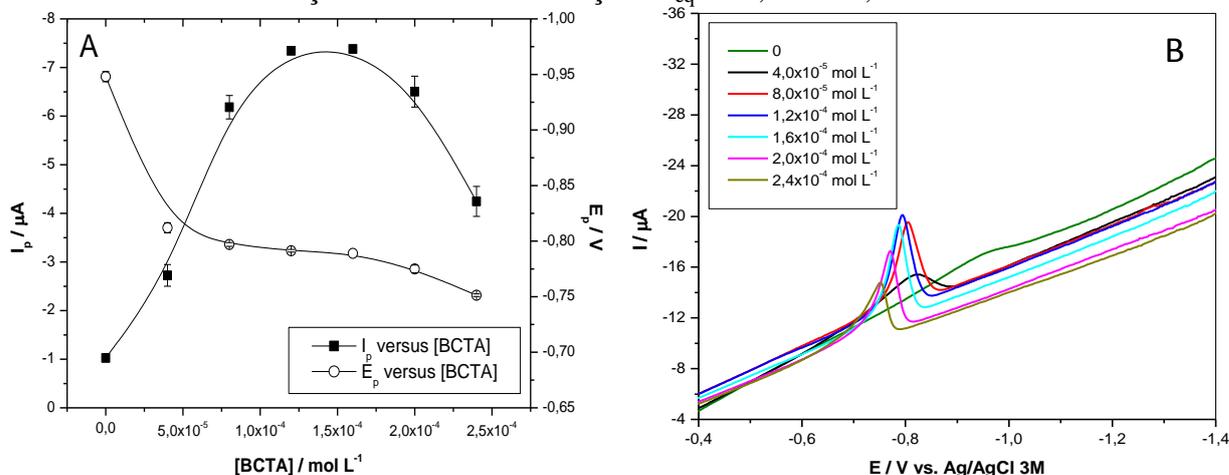
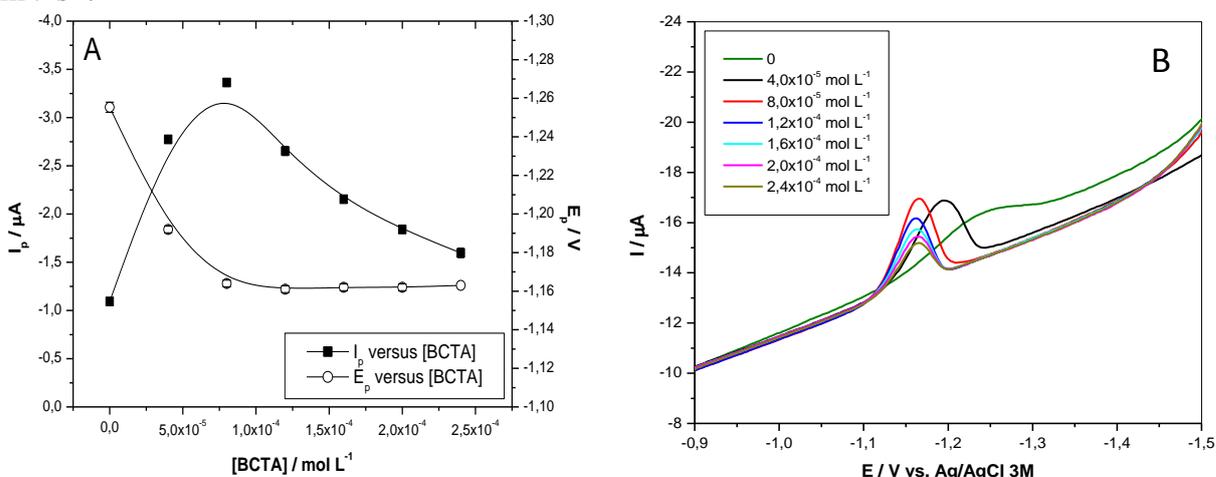


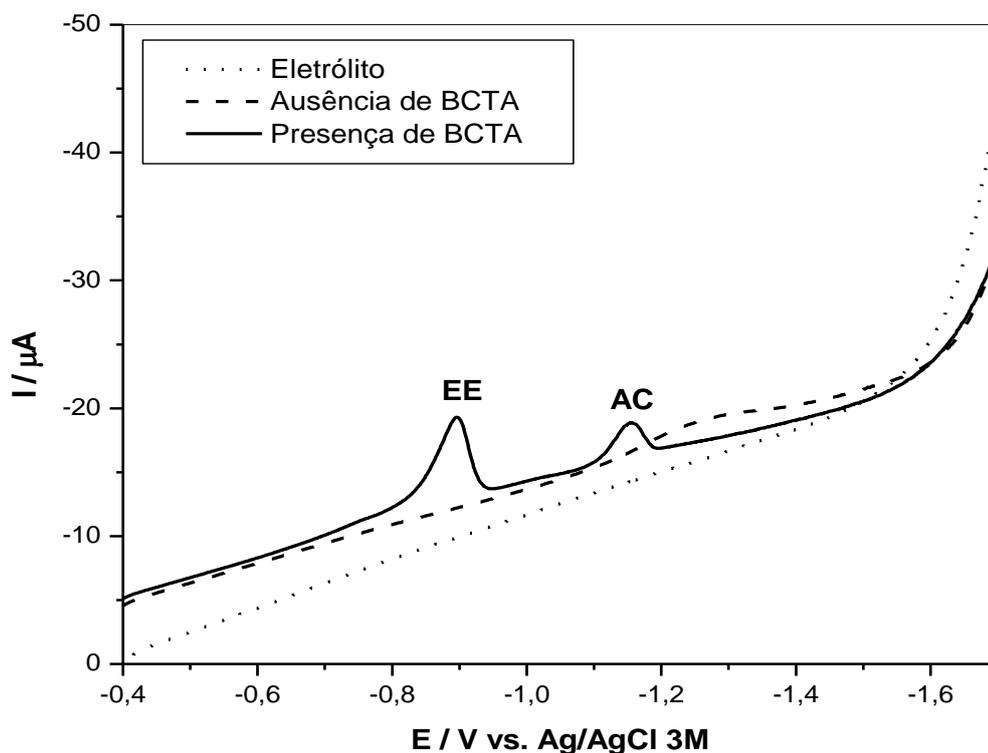
FIGURA 39: (A) Variação da corrente e potencial de pico para redução eletroquímica de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 em diferentes concentrações de BCTA. Condições: $t_{\text{eq}} = 5\text{s}$, $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$ e $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.



As Figuras 38A e 39A apresentaram relação entre a corrente e potencial de pico versus a concentração de BCTA, verifica-se que para o EE2 (Figuras 38A) a corrente de pico aumenta até a concentração de $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a partir desta concentração a corrente tende a diminuir. Já para o AC (Figuras 39A) a corrente de pico aumenta até a concentração de $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, acima desta concentração a corrente diminui. Por meio da Figura 38 observa-se que os potenciais de pico do EE2 deslocam para valores mais positivos quando aumenta a concentração do BCTA. Para o AC Figura 39 podemos verificar que os potenciais de pico desloca para valores positivos até a concentração $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a partir desta concentração os potenciais de picos permanecem praticamente constantes.

Desta forma, optou-se por trabalhar com adição de BCTA na concentração de $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, onde proporcionou uma boa resposta eletroquímica para ambos os hormônios sintéticos. Nesta concentração de BCTA o EE2 apresentou um potencial de pico em torno de -0,85 V, enquanto que o AC apresentou potencial de pico em -1,20 V. Com estes resultados há possibilidade de determinação simultânea de EE2 e AC, como se pode observar na **Figura 40**.

FIGURA 40: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em meio de tampão BR $0,04$ mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA ($8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Condições: $t_{eq} = 5$ s, $\Delta E = 3,00$ mV e $v = 150$ mV s⁻¹.

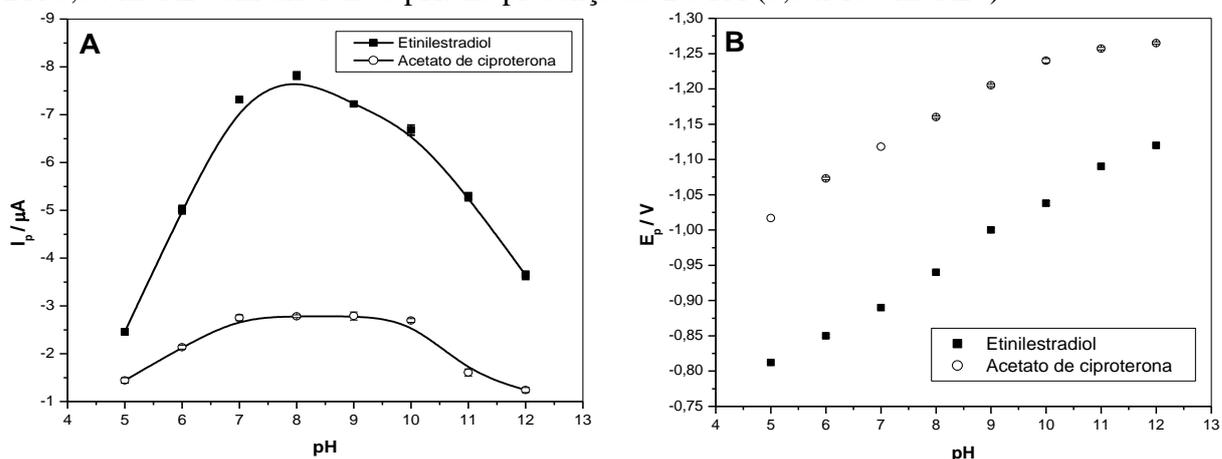


3.3.2 - ESTUDO DO ELETRÓLITO DE SUPORTE

Após verificar que a presença de surfactante BCTA ($8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) favorece a resposta eletroquímica de ambos os hormônios sintéticos, realizou-se o estudo da influência do pH do eletrólito de suporte. Neste estudo utilizou-se tampão BR $0,04$ mol L⁻¹ no intervalo de pH entre 5,0 a 12,0. Em pHs abaixo de 5,0 o pico de redução do EE2 não é detectado. Os resultados deste estudo são apresentados nas **Figuras 41**. Observando as figuras podemos verificar que o potencial e a corrente de pico são influenciadas pelo pH do meio. O potencial desloca-se linearmente para valores negativos com o aumento do pH do meio para ambos os hormônios sintéticos. A corrente de pico de EE2 aumenta com elevação até o pH 8,0 a partir

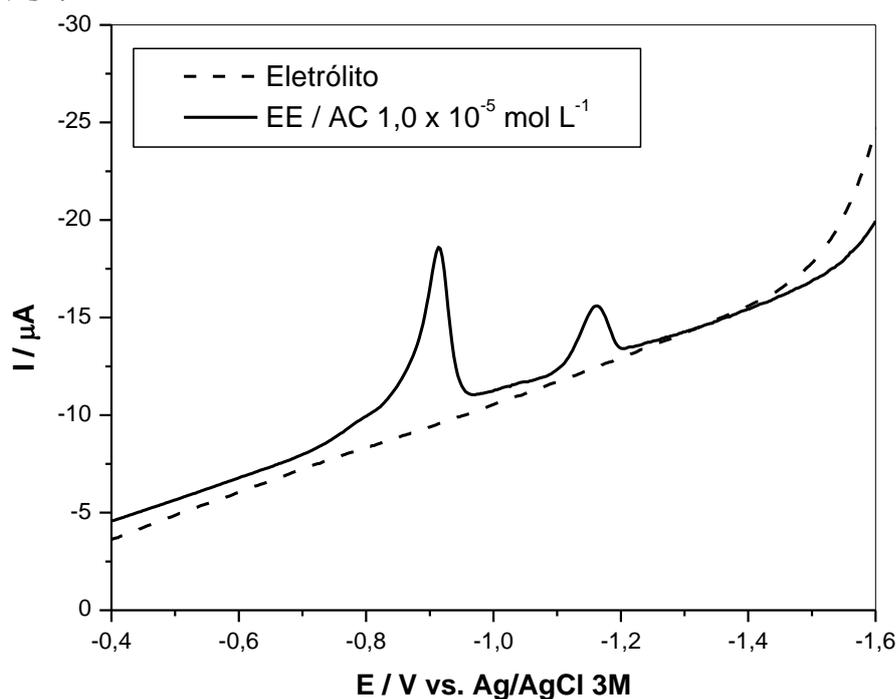
do qual há um decaimento. No caso do AC, a corrente de pico aumenta até o pH 7, permanece praticamente constante até pH 10 e após este pH sofre decaimento.

FIGURA 41: Variação da corrente (A) e potencial (B) de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs na presença de BCTA ($8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).



O resultado do estudo da influência do pH do eletrólito de suporte indicaram que o pH ótimo para determinação simultânea de EE2 e AC é 8,0, onde apresentou-se um melhor perfil voltamétrico (**Figura 42**), uma melhor corrente de pico e uma boa separação entre os picos de redução.

FIGURA 42: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,0, na presença de BCTA ($8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Condições: $t_{\text{eq}} = 5 \text{ s}$, $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$ e $\nu = 150 \text{ mV s}^{-1}$.



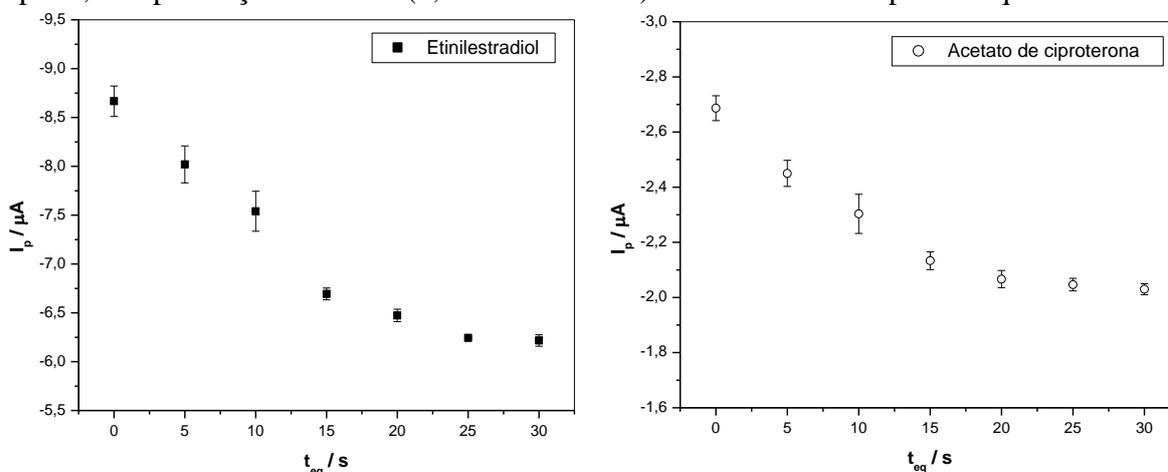
3.3.4 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

Estes estudos foram realizados a fim de aperfeiçoar as melhores condições para a determinação de EE e AC. Os parâmetros foram estudados variando-se um parâmetro em cada conjunto de experimentos.

3.3.4.1 - ESTUDO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO

O estudo do tempo de equilíbrio foi realizado no tempo de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 s, em busca de uma melhor resposta eletroquímica. Na **Figura 43** mostra os gráficos da corrente de pico versus o tempo de equilíbrio para o EE2 e AC, podemos verificar que para ambos os hormônios houve uma diminuição na corrente de pico com o aumento do tempo de equilíbrio, isso ocorre devido à dessorção do analito adsorvido na superfície do eletrodo. Com base nos resultados, o melhor tempo de equilíbrio foi de 15s, o qual apresentou valores menores desvios padrões entre as medidas, tanto para o EE2 e o AC.

FIGURA 43: Variação da corrente de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0 na presença de BCTA ($8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes tempos de equilíbrio.



3.3.4.2 - ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

O estudo da velocidade de varredura foi realizado no intervalo de 50 a 300 mV s^{-1} . Os resultados deste estudo são apresnetados nas **Figuras 44** e **45**, podemos verificar através destas duas figuras há um aumento da intensidade de corrente e um pequeno deslocamento do potencial de pico para valores mais negativos para ambos os hormônios sintéticos.

Analisando os voltamogramas de varredura linear apresentados na **Figura 45** podemos verificar que existe um pequeno alargamento do pico com o aumento da velocidade de varredura, tanto para o etinilestradiol quanto o acetato de ciproperona, este alargamento

dificulta a determinação simultânea do EE2 e AC, sendo assim a velocidade de varredura de 200 mV s^{-1} foi selecionada para os estudos por exibir melhores resultados.

FIGURA 44: Variação da corrente (A) e potencial (B) de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de BCTA ($8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes velocidades de varredura.

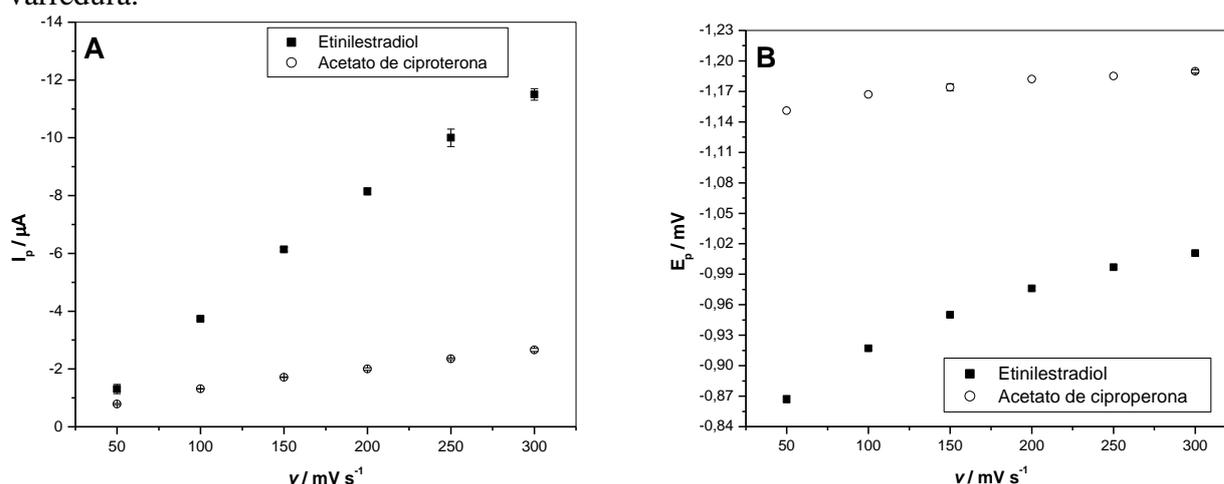
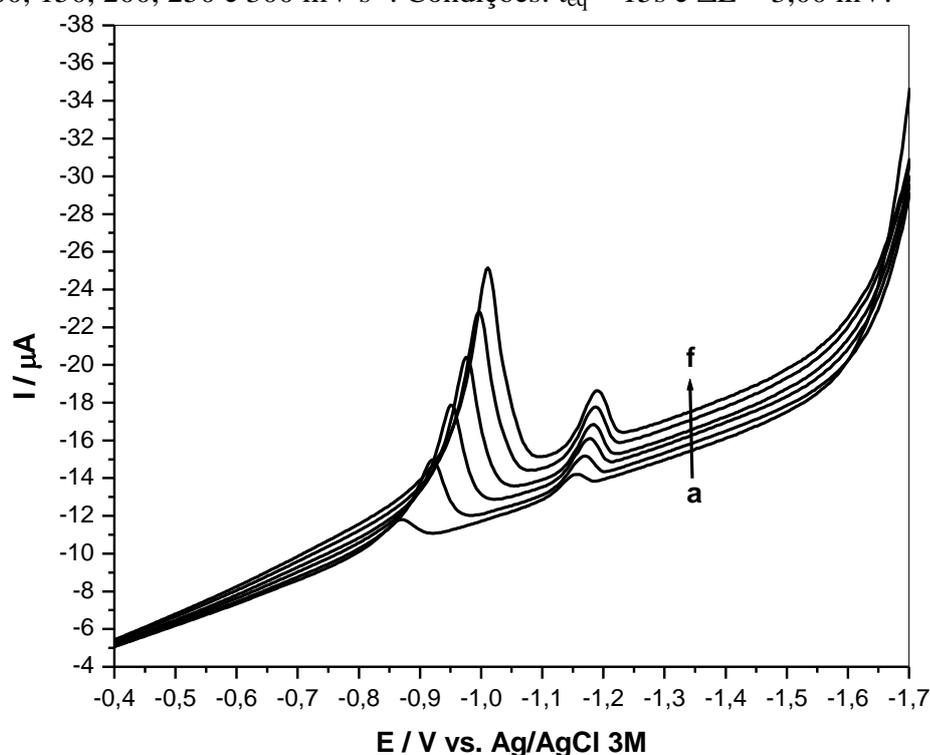


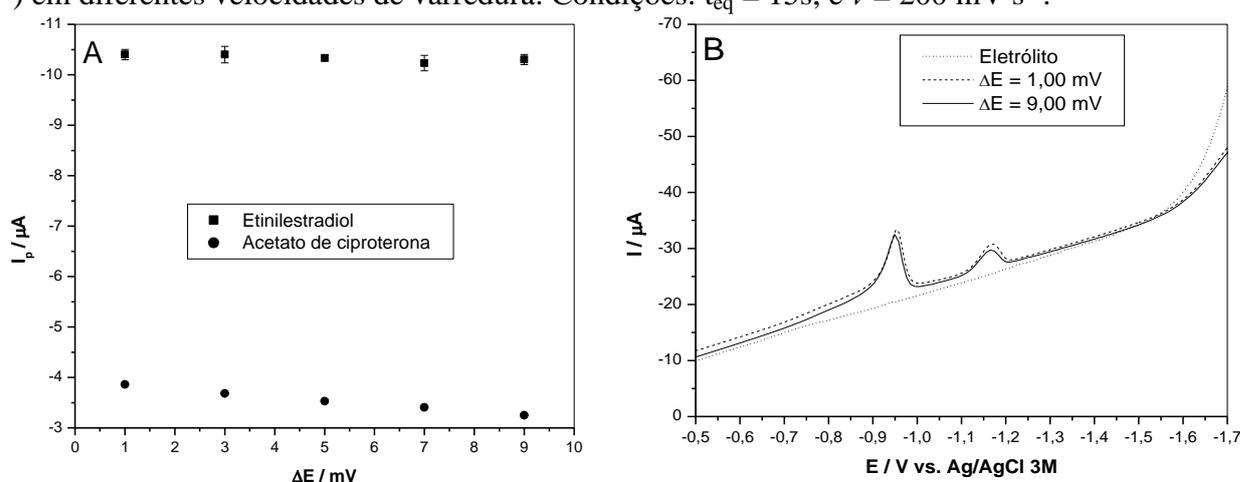
FIGURA 45: Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, na presença de BCTA ($8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes velocidades de varredura (a-f) 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mV s^{-1} . Condições: $t_{\text{eq}} = 15 \text{ s}$ e $\Delta E = 3,00 \text{ mV}$.



3.3.4.3 - ESTUDO DO INCREMENTO DE VARREDURA

O incremento de varredura foi um parâmetro investigado na redução eletroquímica do EE2 e AC, para o estudo o incremento de varredura foi verificado no intervalo de 1,00 a 9,00 mV. Na **Figura 46** são mostrados os resultados deste estudo. Como podemos observar na **Figura 46A** há uma pequena diminuição da corrente de pico para a redução do AC quando se aumenta o incremento. Já para o EE2 a corrente de pico permanece praticamente constante com o aumento do incremento. Por meio dos voltamogramas apresentados na **Figura 46B** podemos verificar que conforme aumenta o incremento existe uma deformação dos picos (ruídos). Portanto, foi selecionado o incremento de 1,00 mV, onde apresentou uma melhor definição dos picos, uma melhor corrente de pico para ambos os hormônios e uma boa repetitividade entre as medidas.

FIGURA 46: (A) Variação da corrente pico. (B) Voltamogramas varredura linear para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e de acetato de ciproterona $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em meio de tampão BR $0,04$ mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA ($8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em diferentes velocidades de varredura. Condições: $t_{eq} = 15s$, e $v = 200$ mV s⁻¹.



3.3.5 - CURVA ANALÍTICA

Após otimização dos parâmetros instrumentais e experimentais para a determinação simultânea do EE2 e AC, foram construídas curvas analíticas, sendo que cada ponto da curva representou a média de três medidas experimentais.

Primeiramente foram construídas curvas analíticas variando apenas uma concentração de cada vez dos hormônios. Na **Figura 47** mostra a curva analítica onde manteve-se a concentração do AC ($1,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e variou-se a do EE2 no intervalo de $(0,64-3,8) \times 10^{-6}$

mol L⁻¹. Na **Figura 48** mostra a curva analítica onde variou-se a concentração do AC no intervalo de (1,5-9,0)×10⁻⁶ mol L⁻¹ e manteve-se a do EE2 (1,9×10⁻⁶ mol L⁻¹).

FIGURA 47: (A) Variação da corrente pico em função da concentração do EE2, mantendo a concentração de AC 5,0×10⁻⁶ mol L⁻¹. (B) Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) em diferentes concentrações de EE2: (a) Eletrólito de suporte, (b-g) (0,64-3,8)×10⁻⁶ mol L⁻¹. Condições: t_{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s⁻¹.

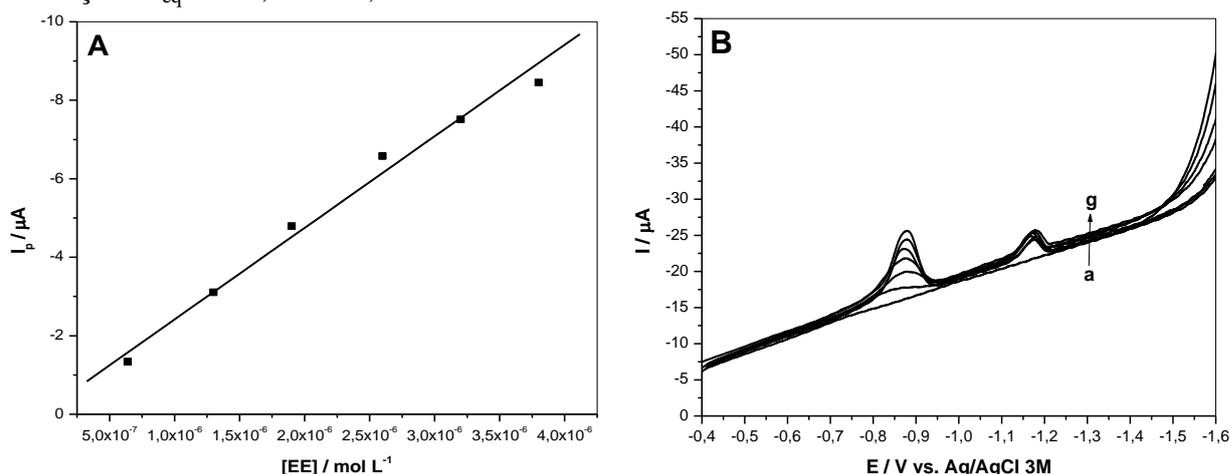
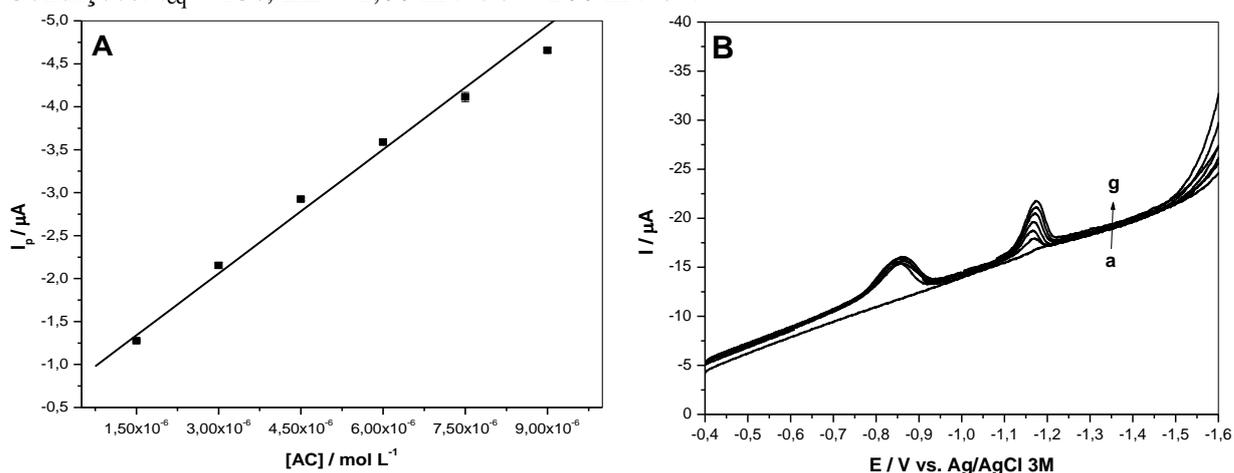


FIGURA 48: (A) Variação da corrente pico em função da concentração do AC, mantendo a concentração de EE2 1,9×10⁻⁶ mol L⁻¹. (B) Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) em diferentes concentrações de AC: (a) Eletrólito de suporte, (b-g) (1,5-9,0)×10⁻⁶ mol L⁻¹. Condições: t_{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s⁻¹.



Por meio da análise das **Figuras 47 e 48** as quais apresentam as curvas analíticas obtidas a partir da variação da concentração dos hormônios individualmente, podemos verificar que não há interferência um hormônio do outro na construção da curva. Com isso voltamogramas de varredura linear foram registrados (**Figura 49**) adicionando-se

concentrações simultâneas dos hormônios EE2 e AC no intervalo de $(0,64-3,8) \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o EE2 e $(1,5-9,0) \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o AC.

Curvas analíticas foram construídas a partir dos valores de corrente de pico obtidos a partir dos voltamogramas apresentados na **Figura 49**. Observa-se que a corrente de pico para ambos os hormônios aumentou linearmente com o aumento da concentração no intervalo estudado. Na **Tabela 11** são apresentados os parâmetros obtidos das curvas analíticas para o EE2 e AC. A partir destes dados obtidos da curva analítica, foi possível calcular o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o AC e EE2, por meio das **Equações 1** (página 40).

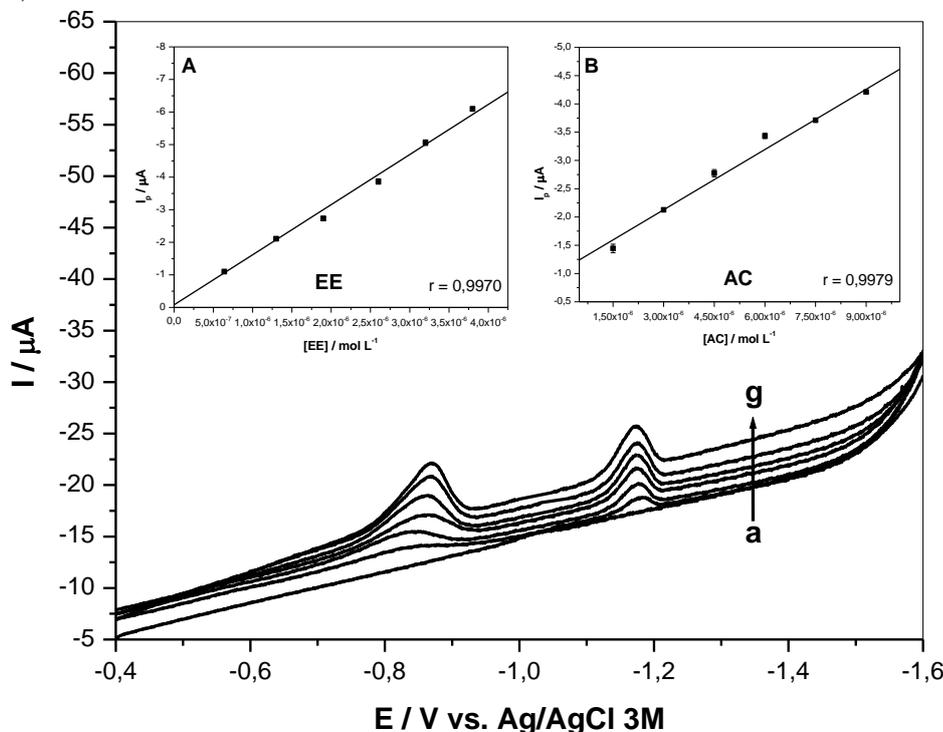
Na **Tabela 11** mostram os valores LD e LQ para os hormônios sintéticos etinilestradiol e acetato de ciproterona, esses valores revelam que a metodologia proposta apresenta detectabilidade adequada para o propósito deste trabalho, deste modo esta metodologia pode então ser empregada para a determinação simultânea dos hormônios EE2 e AC.

TABELA 11: Parâmetros quantitativos obtidos a partir das curvas analíticas para a análise simultânea dos hormônios sintéticos etinilestradiol e acetato de ciproterona.

Parâmetros Avaliados	EE2	AC
Intervalo de concentração (mol L ⁻¹)	$(0,64-3,8) \times 10^{-6}$	$(1,5-9,0) \times 10^{-6}$
Coeficiente linear (A)*	$7,82 \times 10^{-8}$	$1,09 \times 10^{-6}$
Coeficiente angular (A L mol ⁻¹)*	-1,54	-0,346
Coeficiente de correlação (r)*	0,9982	0,9999
LD (mol L ⁻¹)	$6,6 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-7}$
LQ (mol L ⁻¹)	$2,2 \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-7}$

*Média de três curvas analíticas.

FIGURA 49: Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b-g) (0,64-3,8)x10⁻⁶ mol L⁻¹ de EE2 (pico 1) e (1,5-9,0)x10⁻⁶ mol L⁻¹ de AC (pico 2). **Inserção:** Variação da corrente pico em função da concentração de (A) EE2 e (B) AC. Condições: t_{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s⁻¹.



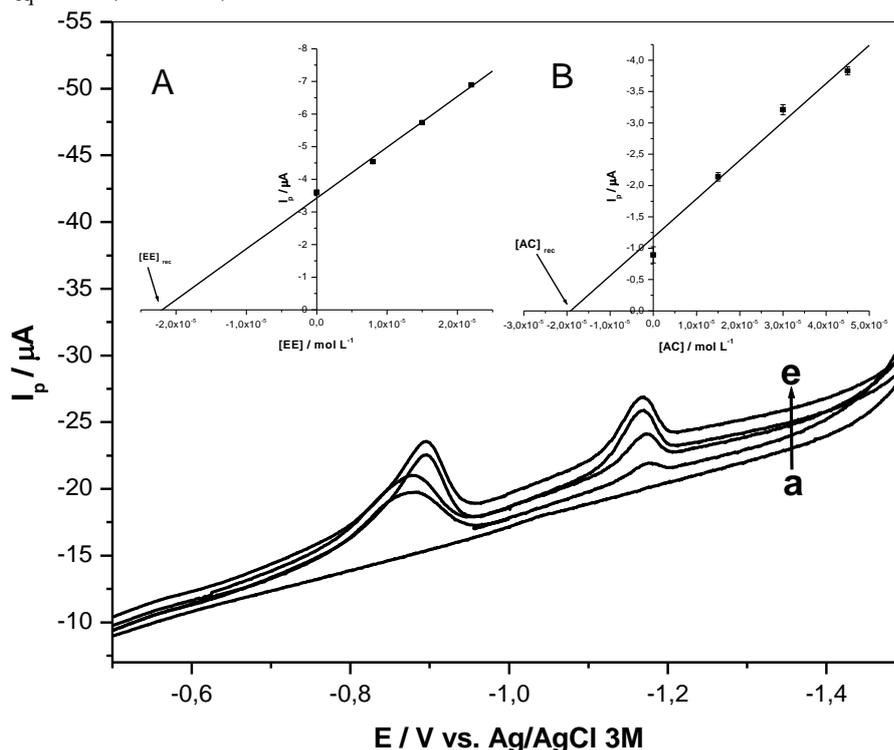
3.3.6 – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS DE URINA E MEDICAMENTO

A fim de avaliar o método proposto, amostra de medicamento (amostra C) contendo etinilestradiol e acetato de ciproterona e amostras de urina foram analisadas. Para determinação simultânea destes dois analitos foi utilizado o método de adição de padrão. Ainda, não foi encontrada nenhuma referência sobre o emprego de técnicas eletroanalíticas para controle de tais substâncias em amostras de medicamentos e urina.

A amostra de urina fortificada com concentrações conhecida dos hormônios sintéticos EE2 (6,5mg L⁻¹) e AC (8,4mg L⁻¹), foram adicionada à célula eletroquímica contendo a solução do eletrólito de suporte tampão BR pH 8,0 e a presença de surfactante catiônico BCTA 8,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. Na **Figura 50** são apresentados os voltamogramas de varredura linear e as curvas de recuperação obtidas para a determinação simultânea dos hormônios sintéticos, por meio da **Figura 50 (voltamograma b)** pode-se verificar que não há nenhum efeito da matriz que poderiam interferir nos sinais analíticos para a determinação do

EE2 e do AC, pois é possível observar apenas dois picos de redução que correspondem aos hormônios EE2 e AC.

FIGURA 50: Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra de urina fortificada com EE2 (6,5mg L⁻¹) e AC (8,4mg L⁻¹), (c-e) adições sucessivas da solução padrão dos hormônios. **Inserção:** Curvas de recuperações do EE2 (A) e AC (B). Condições: t_{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s⁻¹.



As curvas de recuperação apresentadas na **Figura 50** (inserção) foram obtidas em triplicata e apresentaram coeficientes de correlação adequados com valores próximos de 0,999, mostrando a seletividade do método.

Na **Tabela 12** são apresentados os resultados de recuperação obtidos, de acordo com estes resultados, a metodologia desenvolvida pode ser utilizada para a determinação simultânea de EE2 e AC em amostras de urina sem etapas de pré-tratamento, pois não foi observado nenhum efeito de matriz.

TABELA 12: Resultados das curvas de recuperação obtidas para amostra de urina fortificada com os hormônios sintéticos EE2 e AC.

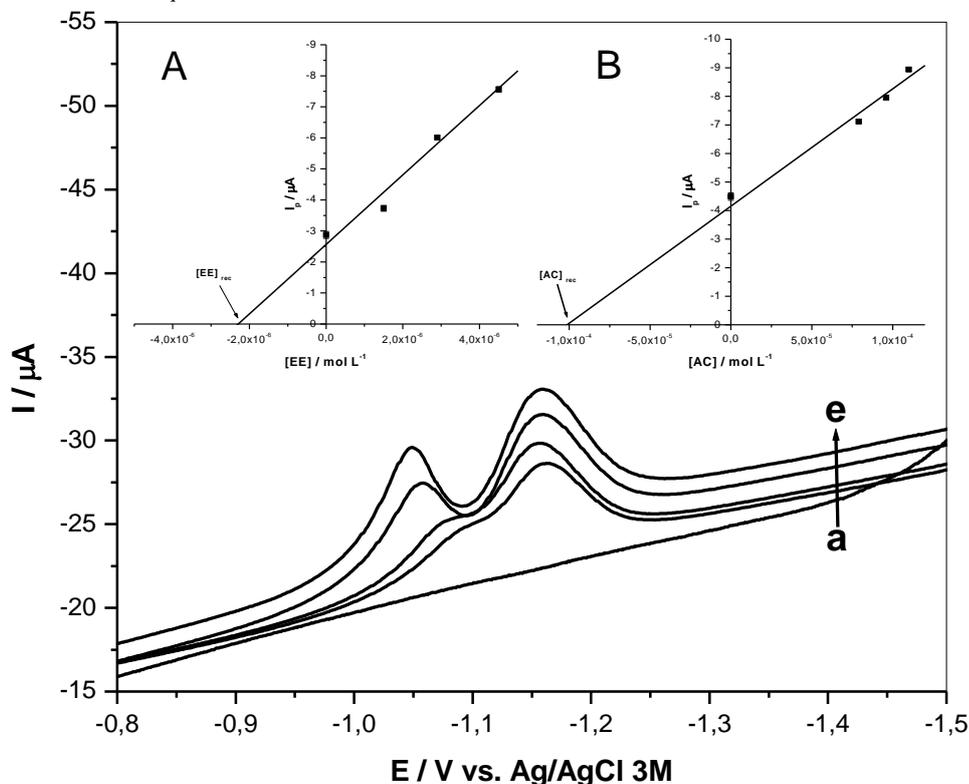
Hormônios sintéticos	[adicionado] / mg L ⁻¹	[recuperado] / mg L ⁻¹	Recuperação / %	Média ¹ / %	DPR ² / %
Acetato de ciproterona	6,52	6,28	96,31	98,67±3,19	3,23
		6,67	102,30		
		6,35	97,39		
Etinilestradiol	8,33	8,00	96,04	97,64±3,63	3,72
		8,48	101,80		
		7,92	95,08		

¹ Média das recuperações e desvio padrão obtidos

² Desvio padrão relativo

A amostra de medicamento empregado para quantificação dos hormônios sintéticos, EE2 e AC, foi o anticoncepcional (amostra C) que contém 0,35 mg de EE2 e 2 mg de AC por comprimidos. Na **Figura 51** são apresentados os voltamogramas de varredura linear registrados para a adição do medicamento (**voltamograma b**) e adições sucessivas da solução padrão dos hormônios sintéticos EE2 e AC e as curvas de recuperação obtidas pelo método de adição de padrão. As curvas de recuperação mostrada na **Figura 51** (Inserção) foram obtidas em triplicata e apresentaram coeficientes de correlação adequados, próximos de 0,999, mostrando a seletividade do método.

FIGURA 51: Voltamogramas varredura linear registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, na presença de BCTA (8,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra medicamento (amostra C) com EE2 (0,035mg) e AC (2,0mg), (c-e) adições sucessivas da solução padrão dos hormônios. **Inserção:** Curvas de recuperações do EE2 (A) e AC (B). Condições: t_{eq} = 15s, ΔE = 1,00 mV e ν = 200 mV s⁻¹.



Observando os resultados obtidos na **Tabela 13** podemos verificar que os teores de hormônios sintéticos encontrados pela metodologia eletroanalítica desenvolvida estão bem próximos dos valores fornecidos no rótulo do anticoncepcional, demonstrando que não existe interferência significativa da matriz desse medicamento na metodologia proposta.

TABELA 13: Resultados dos valores encontrados de EE2 para amostra de medicamento (amostra C).

Hormônios sintéticos	Valor no rótulo / mg por comprimido	Encontrado / mg por comprimido	Média ¹ / %	DPR ² / %
Acetato de ciproterona	2,0	2,19	2,11±0,071	3,36
		2,10		
		2,05		
Etinilestradiol	0,035	0,034	0,034±0,00058	1,71
		0,034		
		0,033		

¹ Média dos valores encontrados e desvio padrão obtidos

² Desvio padrão relativo

Conforme é observado nas **Tabelas 12 e 13**, podemos verificar que os valores de recuperação para a amostra de urina variaram entre 95,08% a 102,30% e os valores de EE2 e AC encontrados nos medicamentos estão bem próximos dos valores fornecidos para o método proposto, mostrando assim exatidão adequada para a metodologia simultânea desenvolvida. Além disso, os valores de desvio padrão relativo foram bastante aceitáveis, estabelecendo uma boa precisão. É importante notar que as espécies presentes tanto na amostra de urina e na de medicamento não causaram nenhuma interferência de matriz.

**CAPÍTULO IV: Construção de eletrodos
impressos de carbono grafite modificado com
PVP**

4.1 - REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo apresenta-se uma breve introdução sobre o material eletródico construído (eletrodos impressos modificados), procedimentos, os resultados e discussão para a resposta obtida para caracterização eletroquímica do eletrodo e aplicação analítica deste material em amostras reais.

4.1.1 - ELETRODOS IMPRESSOS MODIFICADOS

Eletrodos impressos são dispositivos que são produzidos por meio da impressão de diferentes tintas (carbono, ouro, platina ou prata) em vários tipos de substratos plástico ou cerâmicos. Estes eletrodos têm sido amplamente utilizados para análise de diferentes analitos, pois são dispositivos estáveis, reprodutíveis, sensíveis e descartáveis, estão disponíveis comercialmente em diversas companhias (MOHAMED, 2016; RENEDO, et. al., 2007). Nos últimos anos a construção e aplicação de eletrodos impressos modificados têm recebido grande atenção em relação ao aumento da sensibilidade e seletividade de técnicas eletroquímicas.

Até o início da década de 70 somente eletrodos inertes tais como mercúrio, carbono, ouro e platina, eram utilizados em química eletroanalítica, quando então se percebeu que a modificação da superfície inerte do eletrodo poderia conduzir a elaboração de uma grande variedade de sensores para as mais variadas aplicações. Modificar um eletrodo consiste em atribuir e controlar novas propriedades físico-químicas a um eletrodo inerte através do acoplamento de espécies químicas ativas a sua superfície. O sensor resultante pode então consistir de várias camadas sucessivas, depositadas sobre o eletrodo base (NASCIMENTO & ANGNES, 1998).

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante, este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas, os materiais mais utilizados são o ouro, platina, pasta de carbono, carbono vítreo, entre outros (SOUZA, 1997; PEREIRA, et. al., 2002). Existem vários métodos que vem sendo empregados para modificar a superfície dos eletrodos, a seguir são relatados os métodos mais comumente empregados:

- **Modificação por Adsorção:** este método consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo à esta solução. Pode também envolver a disposição desta solução, por exemplo, com o auxílio

de uma micropipeta, sobre a superfície a ser modificada, com posterior evaporação do solvente. Embora este método seja simples, ele apresenta algumas desvantagens, como a adsorção é um processo de equilíbrio, o que leva a ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante a utilização, resultando na perda de reprodutibilidade e durabilidade (SOUZA, 1997; PEREIRA, et. al., 2002).

▪ **Modificação por ligação covalente:** neste método o modificador é ligado covalentemente ao substrato do eletrodo. São empregadas por exemplos reações de silanização (envolvendo organosilanos e óxidos presentes na superfície do eletrodo). Em eletrodos a base de carbono modificação a baseia-se na manipulação da reatividade de seus grupos funcionais oxigenados frente a reagentes como aminas, cloreto de tionila, organosilanos entre outros. Os eletrodos modificados via ligação covalente são mais estáveis em relação aos obtidos pelos demais métodos, entretanto são mais difíceis de preparar, deste modo como a modificação por adsorção, este método gera coberturas de apenas uma monocamada (SOUZA, 1997; PEREIRA, et. al., 2002).

▪ **Modificação por filmes poliméricos:** este método consiste no recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Ao contrário dos métodos anteriores, a modificação por filmes poliméricos permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, o que resulta na ampliação da resposta eletroquímica (SOUZA, 1997; PEREIRA, et. al., 2002).

▪ **Pasta de carbono:** estes eletrodos são formados pela mistura de grafite em pó e um líquido orgânico (aglutinante) que é imiscível em contato com soluções aquosas. Os eletrodos a base de pasta de carbono oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície. Além disso, esses eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, o que os diferem das modificações realizadas em eletrodos sólidos convencionais, onde a modificação ocorre apenas na superfície (PEREIRA, et. al., 2002).

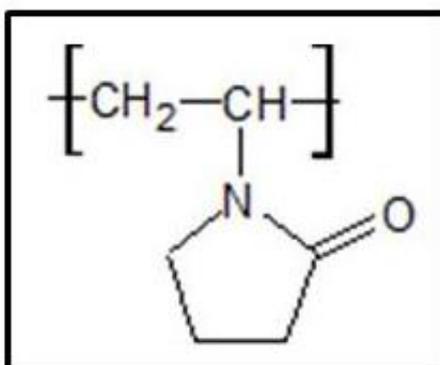
▪ **Materiais compósitos:** estes eletrodos são constituídos de pelo menos uma fase condutora e pelo menos uma fase isolante, resultando em um material com propriedades diferentes dos originais (CALIXTO, et al., 2008). Os eletrodos compósitos são caracterizados quanto à proporção entre as fases isolante e condutora, que podem ser ajustadas para definir uma melhor resposta eletroquímica. A formulação pode garantir mais maleabilidade ou maior rigidez ao compósito, possibilitando desenvolver eletrodos de várias formas e tamanhos e,

garante que possa ser adicionado um modificador químico (CALIXTO, et al., 2008). A utilização de eletrodos compósitos de grafite-parafina (ECGP) possui todas as características citadas anteriormente como: baixo custo, podem ser usados por uma longa faixa de aplicação de pH, possuem alta resistência e baixo tempo de relaxamento. ECGP ainda tem a vantagem de ser facilmente encontrado no mercado, podendo ser utilizado sem maiores cuidados, fácil de manusear, possui matéria-prima barata, não é tóxico, é moldável em baixas temperaturas, fácil manutenção da superfície do eletrodo, uma vez que não precisa lixar excessivamente, pois ela é facilmente regenerada (MENDONÇA, et. al., 2015).

Dentre os diferentes métodos de modificação dos eletrodos, na metodologia apresentada foi construído um eletrodo impresso compósito de carbono grafite-parafina modificado com o polímero polivinilpirrolidona (PVP).

O PVP é um polímero sintético solúvel em água, ele é obtido a partir da síntese por polimerização de monômeros de vinilpirrolidona em água ou isopropanol, possui massa molecular elevada e é constituído por grupo imida anfifílico altamente polar (esta polaridade se deve a estabilidade por ressonância) e uma parte apolar composta por metileno e metil (WANG, et. al., 2012). Na **Figura 52** apresenta a formula estrutura química o polímero PVP.

FIGURA 52: Fórmulas estruturais do PVP.



O uso de PVP apresenta várias vantagens, tais como baixa toxicidade, biocompatibilidade, entre outros. Além disso, apresenta forte capacidade adsorção com compostos fenólicos, devido a ligações de hidrogênio entre o grupo imida do polímero e o grupo hidroxila (YAN, et. al., 2006). Devido às estas características citadas, o PVP pode ser utilizado para modificar a superfície dos eletrodos fornecendo diferentes propriedades elétricas na superfície eletrodo/solução.

4.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 - REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau analítico e a água utilizada foi ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida por um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore).

A solução do padrão etinilestradiol (Sigma Aldrich) $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada pela dissolução da massa apropriada em 10 mL de etanol (99,6%, Dinâmica). A solução foi transferida para frasco de cor âmbar e estocadas sob refrigeração até ser utilizada.

Para realizar as medidas voltamétricas foram utilizados como eletrólito de suporte tampão BR que foi preparada pela mistura do ácido acético (Merck), ácido bórico (Merck) e ácido fosfórico (Merck), todos com concentração de 0,04 mol L⁻¹ e tampão acetato foi preparado a partir de uma solução de ácido acético 0,04 mol L⁻¹ (Merck). Ambos os tampões o pH foi ajustado com hidróxido de sódio (Merck) 1,0 mol L⁻¹.

Para preparar os eletrodos de trabalho foram utilizados pó de grafite sintético (tamanho da partícula < 20 micron, Sigma Aldrich), polímero PVP (Sigma Aldrich), parafina (sólida – vela) e eletrodos impressos comerciais descartados.

As amostras de medicamentos utilizadas para a determinação de EE2 foram obtidas em farmácias situadas na cidade de Campo Grande – MS.

4.2.2 - EQUIPAMENTOS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo GPSTAT 128N (Eco Chemie), interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9 (Eco Chemie) para aquisição dos dados. Para fazer a conexão dos eletrodos impressos ao potenciostato utilizou-se um conector específico da Dropsens (ref. CAC).

Utilizou-se uma balança Sartorius R160 para realizar todas as pesagens.

Foram utilizados um pH-metro digital (Tecnopon/modelo MPA-20), juntamente com um agitador magnético TM 125 Shott para o ajuste do pH das soluções eletrolíticas.

As adições de volumes na célula eletroquímica e as diluições das soluções foram realizadas com o auxílio de micropipetas HTL Série LABMATE, com capacidade de 2 a 20 µL, 20 a 200 µL e de 100 a 1000 µL.

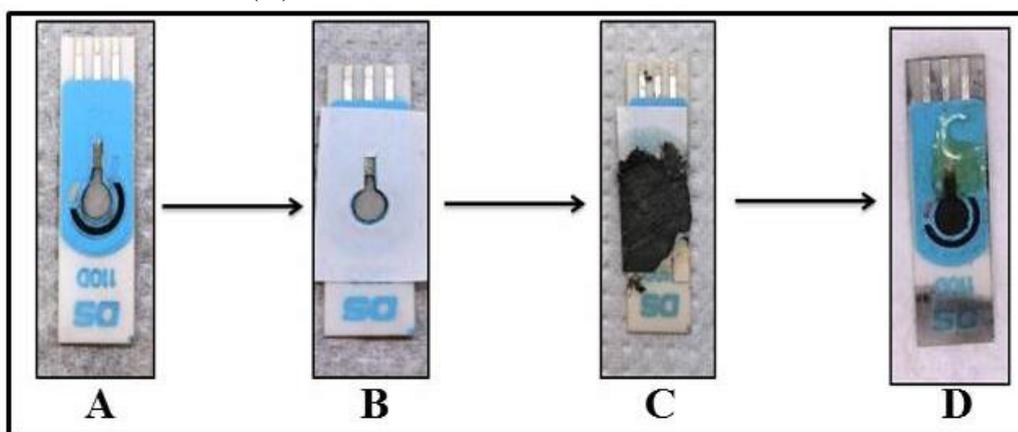
Na preparação das amostras foram utilizados banho ultrassom UNIQUE modelo USC-1800A e uma centrífuga da Sigma Laborzentrifugen (Modelo no 94199-2002, Germany) para separação do sobrenadante.

Para preparar o eletrodo de trabalho utilizou-se uma chapa aquecedora redonda (QUIMIS), furador de orifício de 4 mm de diâmetro e fita crepe.

4.2.3 – CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO GRAFITE MODIFICADO COM O POLÍMERO PVP (EICG – PVP)

Para a construção dos EICG – PVP foram utilizados eletrodos impressos comerciais que seriam descartados. Primeiramente foi removido o eletrodo de trabalho com o auxílio de uma espátula pequena, o eletrodo de referência (prata) e o contra eletrodo (carbono) foram reaproveitados. Após a remoção do eletrodo de trabalho fez-se um polimento com lixa d' água 2000 (**Figura 53A**). Posteriormente, com o auxílio de um furador de 4 mm em fita crepe fez-se um molde com para isolar o eletrodo de trabalho, em seguida este molde foi posicionado sobre o eletrodo impresso (**Figura 53B**). O EICG – PVP foi preparado pela mistura de pó de grafite, parafina (vela) e o modificador (PVP) nas proporções desejadas, para homogeneização da mistura foi utilizada uma chapa aquecedora com a temperatura de aproximadamente 50 °C. Em seguida, a mistura foi transferida para o eletrodo com o molde (**Figura 53C**), após a secagem fez-se um polimento com auxílio de uma lixa 2000, posteriormente o molde foi retirado e o contato elétrico foi isolado com resina epóxi seca por 24 horas (**Figura 53D**).

FIGURA 53: Processo de fabricação dos EICG – PVP. (A) Eletrodo impresso comercial descartável com a remoção o eletrodo de trabalho. (B) Posicionamento do molde. (C) Transferência da mistura. (D) Eletrodo finalizado.



4.2.4 - EXPERIMENTOS VOLTAMÉTRICOS

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando EICG – PVP como eletrodo de trabalho. A fim de registrar todos os voltamogramas, alíquotas apropriadas de solução estoque de EE2 e de surfactantes foram diluídas em 10,0 ml de solução do eletrólito de suporte no pH desejado. Antes de cada medida, lavou-se a superfície do eletrodo de trabalho com água deionizada. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente.

4.2.5 - PREPARO DAS AMOSTRAS

4.2.5.1 - AMOSTRA DE MEDICAMENTO

Foram utilizados duas amostra de medicamentos (amostra A e B) para a determinação de EE2. Ambas as amostras são preparadas das seguintes formas: Primeiramente pesou-se a massa de 5 comprimidos triturados em um tubo de ensaio, adicionou-se 3 mL de etanol. Após, a mistura foi levada para o ultrassom durante 5 minutos, a seguir o material foi separado por centrifugação durante cerca de 5 minutos a 4000rpm. A camada sobrenadante foi filtrada com o auxílio de uma seringa e filtro 0,45µm em um balão volumétrico, este procedimento foi repetido 3 vezes, após completou-se o balão volumétrico com etanol. Esta solução foi submetida a análise eletroanalítica e a quantificação de EE2 na amostra de medicamento, realizada pelo método de adição de padrão. O esquema da **Figura 5** (página 18) ilustra o procedimento realizado para o preparo da amostra.

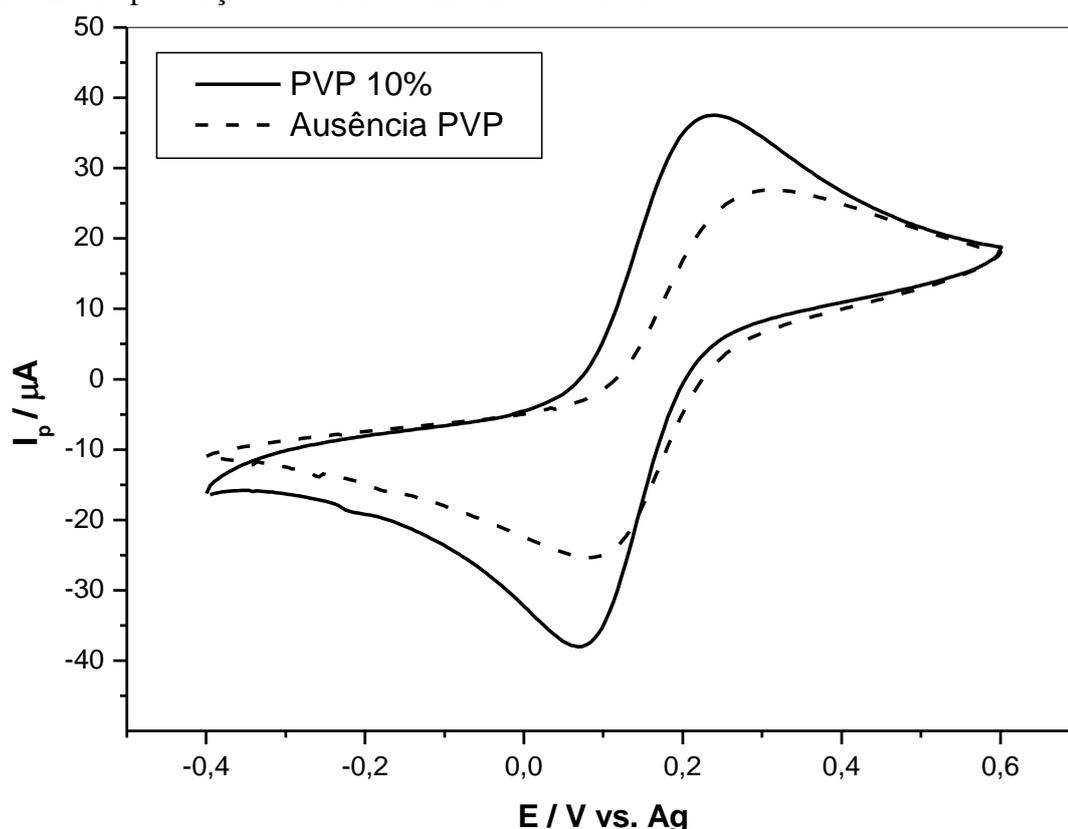
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 - ESTUDOS INICIAIS

Primeiramente foram realizados testes para verificar se a modificação do EICG – PVP melhoraria na resposta eletroquímica. A utilização de 10% de PVP foi otimizado com base nos resultados reportados na literatura (ZHANG, et. al., 2015; YANG, et. al., 2014; WANG, et. al., 2013; HE, et. al., 2004) nos quais divulgam que 10% é o que corresponde uma melhor resposta eletroquímica, sendo assim utilizou-se a técnica de voltametria cíclica, uma solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte e K₃[Fe(CN)₆] 1,0x10⁻³ mol L⁻¹, janela de potencial entre -0,4 a 0,6 V vs Ag e velocidade de varredura de 60 mVs⁻¹.

Na **Figura 54** mostra os voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo 60/40 (C(carbono)/P(parafina), % m/m) e 50/40/10 (C(carbono)/P(parafina)/PVP, % m/m), por meio desta figura podemos verificar que o eletrodo modificado com polímero apresentou um melhor perfil voltamétrico e gerou um aumento na intensidade de correntes anódica e catódica.

FIGURA 54: Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na presença e ausência do modificador PVP.

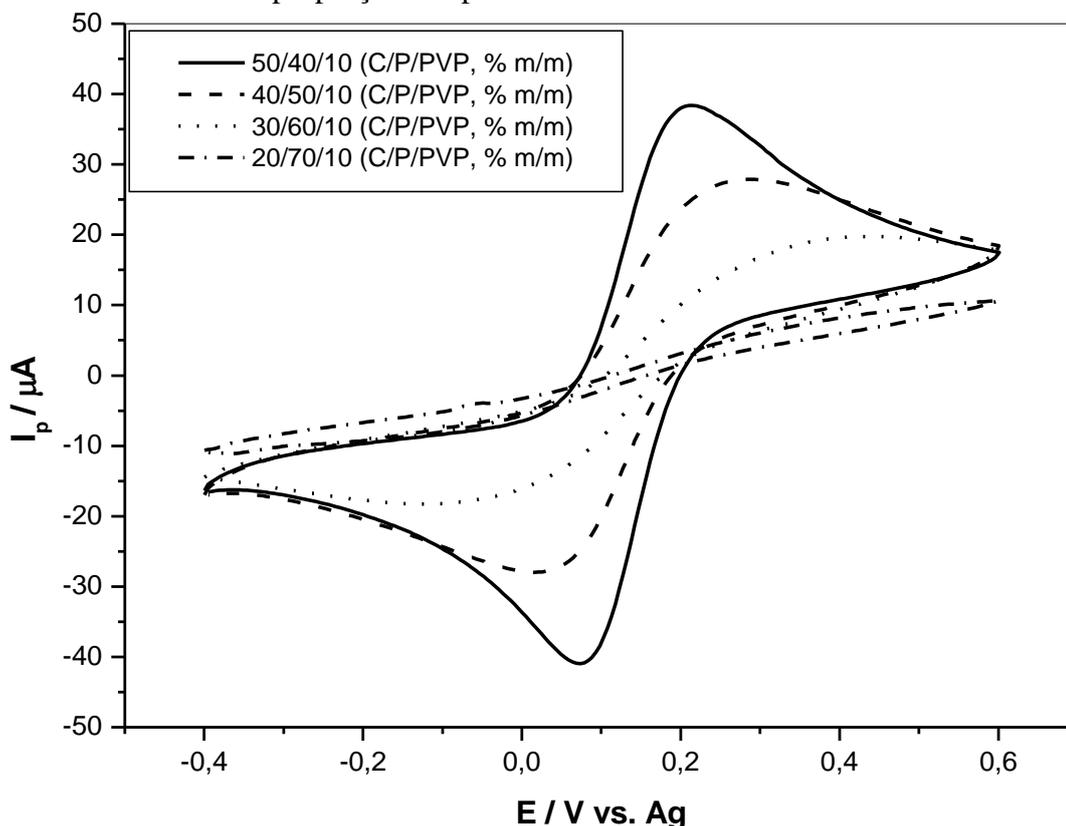


4.3.2 – ESTUDO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE AGLUTINANTE

Após verificar que a modificação do eletrodo com PVP apresentou uma melhor resposta eletroquímica para $K_3[Fe(CN)_6]$, realizou-se um estudo para verificar se a proporção de aglutinante parafina (vela) melhoraria a resposta eletroquímica. Para isso, foram feitos quatro eletrodos com as seguintes proporções: 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m); 40/50/10 (C/P/PVP, % m/m); 30/60/10 (C/P/PVP, % m/m) e 20/70/10 (C/P/PVP, % m/m). Na **Figura 55** são apresentados os voltamogramas cíclicos comparando as diferentes proporções de parafina. Verifica-se que a composição 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) apresentou-se um melhor perfil voltamétrico e um aumento na corrente de pico catódica e anódica. Em elevadas

proporções de parafina, há baixas corrente de pico que são atribuídas à fraca transferência de carga dos eletrodos, contudo a melhor proporção de aglutinante (parafina-vela) para a fabricação deste eletrodo é de 40%.

FIGURA 55: Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em meio de KCl $0,5$ mol L^{-1} em diferentes proporções de parafina.

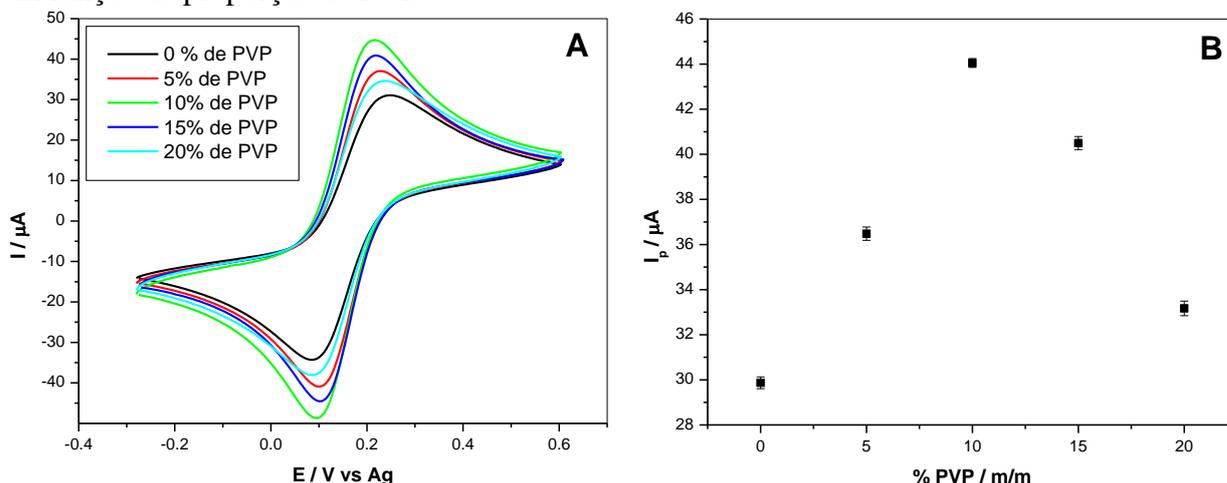


4.3.3 – ESTUDO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DO AGENTE MODIFICADOR (PVP)

Após averiguar que a presença do agente modificar (PVP) e a proporção de 40% de aglutinante (parafina-vela) apresentou uma boa resposta eletroquímica para $K_3[Fe(CN)_6]$, realizou-se um estudo para verificar se a proporção do agente modificador - PVP melhoraria a resposta eletroquímica. Sendo assim, foram construídos cinco eletrodos com as seguintes proporções: 60/40 (C/P, % m/m); 55/40/5 (C/P/PVP, % m/m); 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m); 45/40/15 (C/P/PVP, % m/m) e 40/40/20 (C/P/PVP, % m/m). A **Figura 56A** mostra os voltamogramas cíclicos comparando as diferentes proporções de agente modificar – PVP, por meio destes voltamogramas foi possível encontrar os valores de corrente de pico anódica na qual apresenta na **Figura 56B**. Analisando a **Figura 56** podemos verificar que a composição

50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) apresentou-se um melhor perfil voltamétrico e um aumento na corrente de pico catódica e anódica.

FIGURA 56: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em meio de KCl $0,5$ mol L^{-1} em diferentes proporção de PVP. (B) Variação da corrente de pico anódica em função da proporção de PVP.



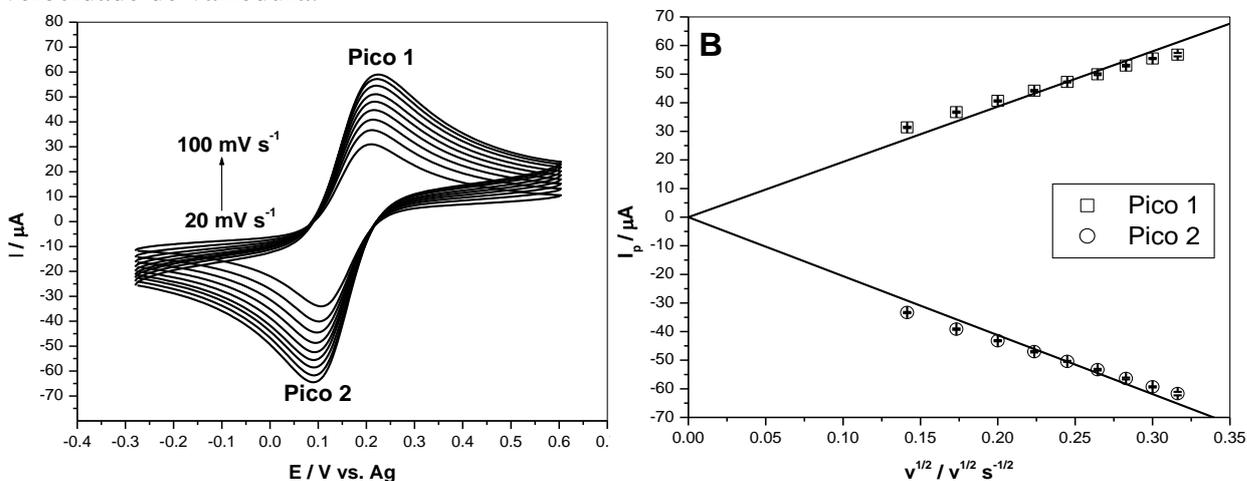
A área eletroativa dos eletrodos com diferentes proporções de agente modificador (PVP) foi calculada através da equação de Randles-Sevcik, representada pela **Equação 2**. Para isso, utilizou-se a técnica de VC e uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em KCl $0,5$ mol L^{-1} , com um coeficiente de difusão tabelado de $6,39 \times 10^{-6}$ $cm^2 s^{-1}$.

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad \text{Equação 2}$$

onde I_p é a corrente de pico; n é o número de elétrons envolvidos; A é a área do eletrodo (cm^2); C é a concentração do analito ($mol cm^{-3}$); ν é a velocidade de varredura ($V s^{-1}$) e D é o coeficiente de difusão ($cm^2 s^{-1}$).

Na **Figura 57A** são apresentados os voltamogramas registrados em diferentes velocidades de varredura para o eletrodo na proporção de 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m), podemos verificar que a corrente de pico aumenta linearmente com o aumento da velocidade para ambos os picos, este comportamento foi observado para as demais proporções. Por meio dos voltamogramas registrados em diferentes velocidades é possível encontrar a relação entre a corrente de pico anódica e catódica versus a raiz quadrada da velocidade de varredura (**Figura 57B**), portanto através dos valores de inclinação obtidos das curvas pode se calcular área eletroativa dos diferentes eletrodos, os quais estão apresentados na **Tabela 14**.

FIGURA 57: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em meio de KCl 0,5 mol L⁻¹ em diferentes velocidade de varredura para o eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m). (B) Variação da corrente de pico catódica e anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.



A partir dos resultados da área eletroativa dos diferentes eletrodos pode-se calcular o fator de rugosidade (f_r) que pode ser descrito como a semelhança que é a área eletroativa de uma superfície apresenta com a sua área geométrica (0,125 cm²), por meio da **Equação 3** (BENITESA, et al., 2014). Na **Tabela 14** são apresentados os valores de fator de rugosidade.

$$f_r = \frac{A_{\text{eletroativa}}}{A_{\text{geométrica}}} \quad \text{Equação 3}$$

A fim de verificar qual seria a melhor proporção de agente modificar (PVP) foram realizadas medidas utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Após a realização das medidas foram coletados os gráficos de Nyquist dos quais obteve-se os valores de resistências de transferência de elétrons (R_{ct}) onde são apresentados na **Tabela 14**. Observando se os dados obtidos de R_{ct} , podemos verificar que o eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m), apresentou uma menor resistência de transferência de elétrons, consequentemente, esta composição terá uma maior facilidade da reação oxidação/redução.

A partir dos valores de R_{ct} e a área eletroativa calculada foi possível calcular a constante heterogênea (K°) dos eletrodos através da **Equação 4**:

$$K^\circ = \frac{RT}{F^2 R_{ct} AC} \quad \text{Equação 4}$$

Onde R é a constante heterogênea dos gases, T é a temperatura absoluta, F é a constante de Faraday, R_{ct} é a resistências de transferência de carga, A é a área do eletrodo e C é a concentração das espécies na solução (BARD & FAULKNER, 2000).

A constante heterogênea representa a velocidade de uma reação redox e é um indicativo da facilidade com que as reações ocorrem, de modo que quanto maior é a constante maior é a velocidade da reação redox (BARD & FAULKNER, 2000). Na **Tabela 14** apresentam os valores de K° calculados utilizando a área eletroativa, podemos verificar que o eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) apresentou um valor de K° maior em relação aos outros eletrodos, portanto a velocidade de transferência de elétrons é favorecida e consequente este eletrodo foi otimizado para o desenvolvimento do trabalho.

TABELA 14: Valores de área eletroativa, fator de rugosidade, resistência de transferência de elétrons e constante de velocidade heterogênea padrão.

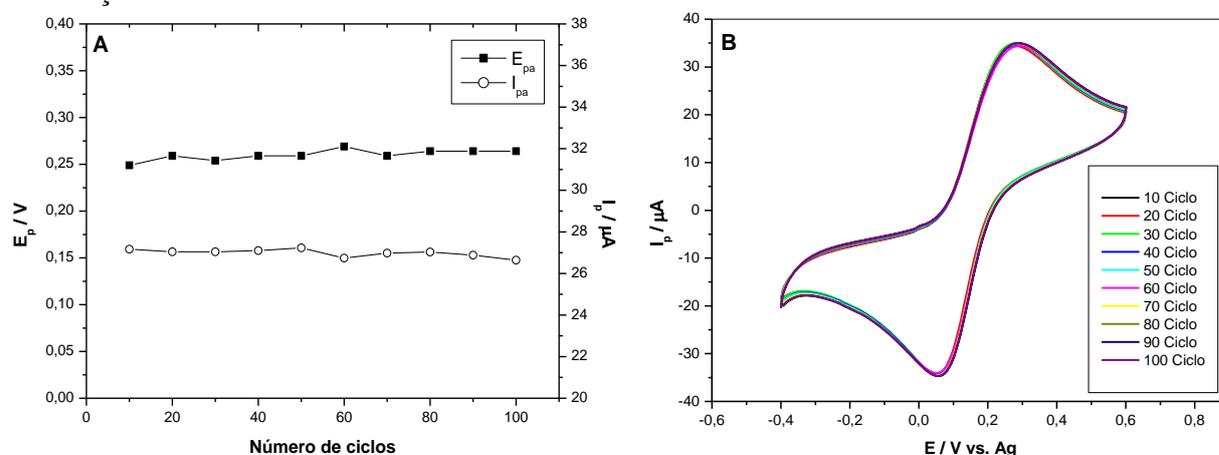
Eletrodos (C/P/PVP, % m/m)	$A_{\text{eletroativa}} (\text{cm}^2)$	f_r	Rct (Ω)	$K^{\circ}_{\text{eletroativo}} (\text{cm s}^{-1})$
60/40	0,1434	1,147	938,2	$1,98 \times 10^{-3}$
55/40/5	0,1827	1,485	420,8	$3,46 \times 10^{-3}$
50/40/10	0,2200	1,760	326,4	$3,71 \times 10^{-3}$
45/40/15	0,2006	1,604	372,1	$3,57 \times 10^{-3}$
40/40/20	0,1690	1,285	440,0	$3,58 \times 10^{-3}$

Dando ênfase ao eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m), que demonstrou ser o melhor para posteriores aplicações analíticas dentre as composições analisadas, por meio do estudo de velocidade de varredura demonstrou que a razão entre as correntes de pico anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}) obtidas dos voltamogramas (**Figura 57**) foi de aproximadamente 1. Esse comportamento mostra que a reversibilidade do sistema atribuída ao processo redox apresentado pelo par $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$. A relação linear existente entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o processo de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução é controlado apenas pela difusão das espécies (BARD & FAULKNER, 2000).

4.3.4 – ESTUDOS DE REPETIBILIDADE, REPRODUTIBILIDADE E ESTABILIDADE

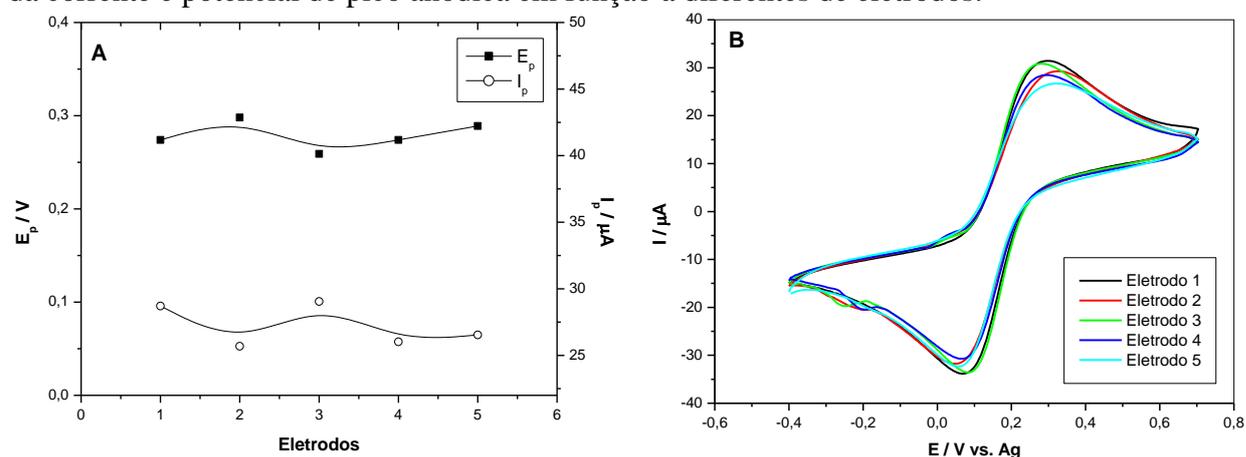
A repetibilidade (máxima diferença aceitável entre repetições, na mesma amostra) da resposta eletroquímica do eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) foi realizada 100 ciclos voltamétricos contínuos. A **Figura 58A** apresenta o gráfico da corrente e potencial de pico em função do número de ciclos, por meio desta figura podemos verificar que a I_p e o E_p permaneceram praticamente constante com uma pequena variação, ou seja, 1,53% para a I_p e 2,18% para o E_p . De modo geral, nota-se através dos voltamogramas (**Figura 58B**) que há possibilidade de realizar várias medidas sem alteração nas respostas deste eletrodo.

FIGURA 58: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em meio de KCl $0,5$ mol L^{-1} em 100 ciclos contínuo. (B) Variação da corrente e potencial de pico anódica em função ao número de ciclos.



Para avaliar a reprodutibilidade do eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) foram realizadas medidas voltamétricas em um único eletrólito com cinco eletrodos com a mesma proporção e composição. As correntes e os potenciais de pico para as medidas realizadas nos cinco eletrodos sofreram uma pequena variação, conforme é apresentado na **Figura 59**. Obteve-se um desvio padrão relativo de 5,76% para a I_p e 5,41% para o E_p .

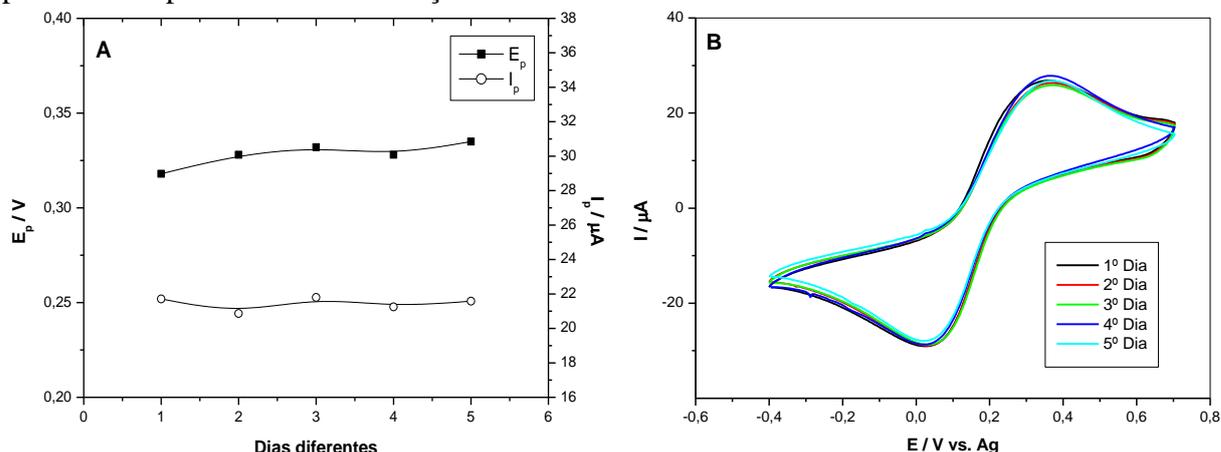
FIGURA 59: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em meio de KCl $0,5$ mol L^{-1} em diferentes eletrodos com a mesma proporção e composição. (B) Variação da corrente e potencial de pico anódica em função a diferentes de eletrodos.



A fim de verificar a estabilidade do eletrodo 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) repetiu-se o mesmo procedimento voltamétrico em cinco dias seguidos, utilizando o mesmo eletrodo. Como podemos observar na **Figura 60** que as correntes e os potenciais de pico mostram-se muito similares, os desvios padrões relativos obtidos foram de 4,16% para a I_p e 2,80% para o

E_p . O resultado indica que os dias de uso não alteram a resposta do eletrodo o qual mantém a sua eficiência.

FIGURA 60: (A) Voltamogramas cíclicos para o $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes dias com um mesmo eletrodo. (B) Variação da corrente e potencial de pico anódica em função ao número de dias.

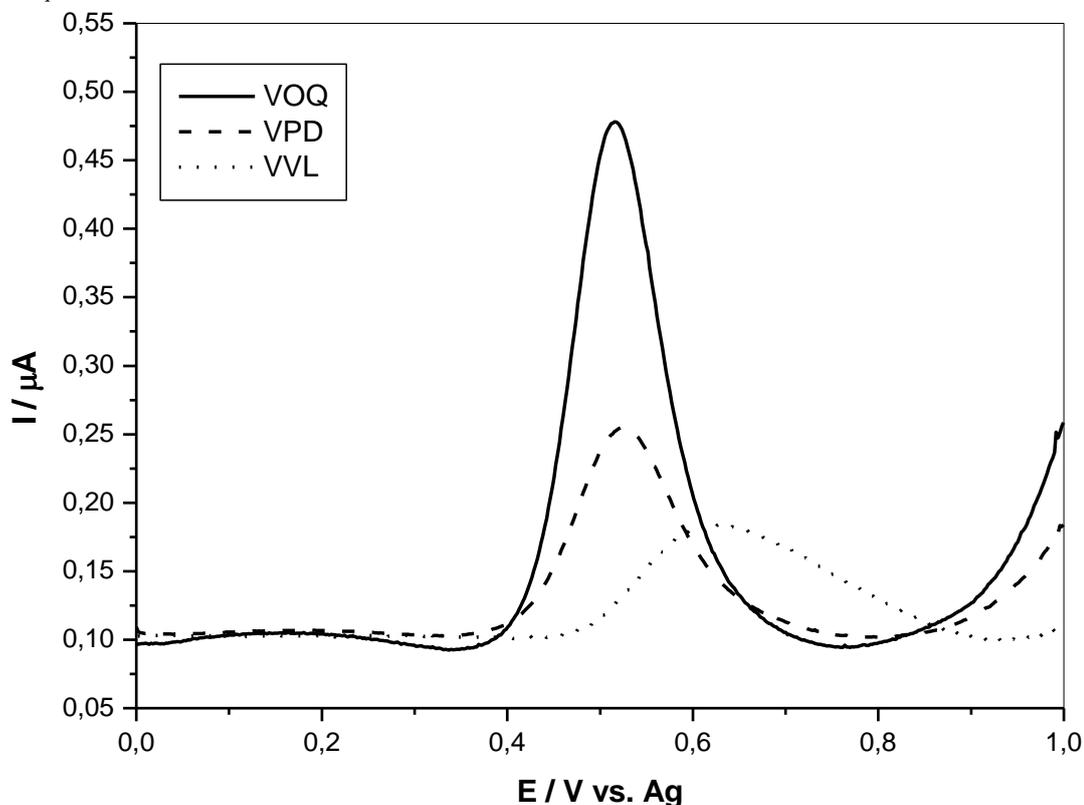


4.3.5 – APLICAÇÃO ELETROANALÍTICA DO ELETRODO IMPRESSO 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m)

Para avaliar a resposta eletroquímica de EE2 na presença do eletrodo impresso 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m), realizou-se em estudo para verificar qual seria a melhor técnica a ser utilizada para determinação do hormônio sintético etinilestradiol. As técnicas utilizadas para investigar a oxidação eletroquímica do EE2 ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) foram VOQ, VPD e VVL.

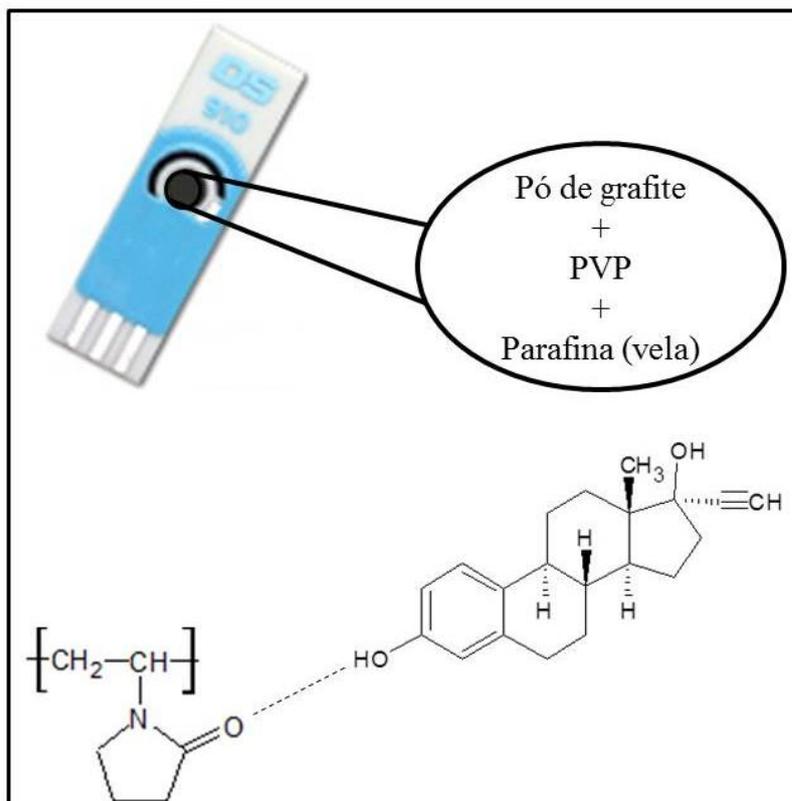
A **Figura 61** apresenta os voltamogramas obtidos para as três técnicas, os parâmetros foram ajustados para se obter a mesma velocidade de varredura. Observando a figura podemos verificar que a técnica de VOQ (**voltamograma** —) apresentou uma maior corrente de pico em relação às técnicas de VPD e VVL. Como pode ser observado também, o sinal analítico obtido na VOQ exibiu uma boa definição com excelente resolução, conseqüentemente, esta técnica foi selecionada para o desenvolvimento da metodologia.

FIGURA 61: Voltamogramas registrados para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 8,0), em diferentes técnicas. Condições para VOQ: $t_{eq} = 15$ s, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV; para VPD: $t_{eq} = 15$ s, $t_{modulação} = 0,05$ s, intervalo de tempo = 0,5 s, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 40,05$ mV e para VVL: $t_{eq} = 15$ s, $\nu = 100$ mV s⁻¹ e $\Delta E = 4,95$ mV.



A presença do polímero PVP no eletrodo de trabalho, melhora a resposta eletroquímica, pois há uma interação de ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila do hormônio EE2 com o grupo imida do PVP, proporcionando assim a uma melhor corrente de pico (FRANZOI, et al., 2008; PIOVESAN & SPINELLI, 2014). O esquema da **Figura 62** ilustra a interação do modificado PVP com o analito EE2.

FIGURA 62: Representação da interação do polímero (PVP) com o analito etinilestradiol.



4.3.5.1 – ESTUDO DO ELETROLITO DE SUPORTE

Realizou-se um estudo da influência do pH da solução do eletrólito de suporte, neste estudo foram empregadas soluções tampão BR 0,04 mol L⁻¹ com valores de pH na faixa de 2,0 e 12,00. A partir dos voltamogramas (**Figura 63**) registrados em diferentes pH, foram construídos os gráfico de I_p e E_p em função do pH do meio que são apresentados na **Figura 64 (A e B)**. Observando as **Figuras 63 e 64** podemos verificar que o potencial e a corrente de pico depende do pH do meio. Os valores de corrente de pico diminuiram entre o intervalo de pH 2,0 a 7,0, a partir deste valor a I_p permanece constante até pH 10 e após este pH a um decaimento.

FIGURA 63: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em meio de tampão BR $0,04$ mol L⁻¹, em diferentes pHs. Condições: $t_{eq} = 15$ s, $f = 20$ Hz, $\Delta E = 4,95$ mV e $E_{sw} = 19,95$ mV.

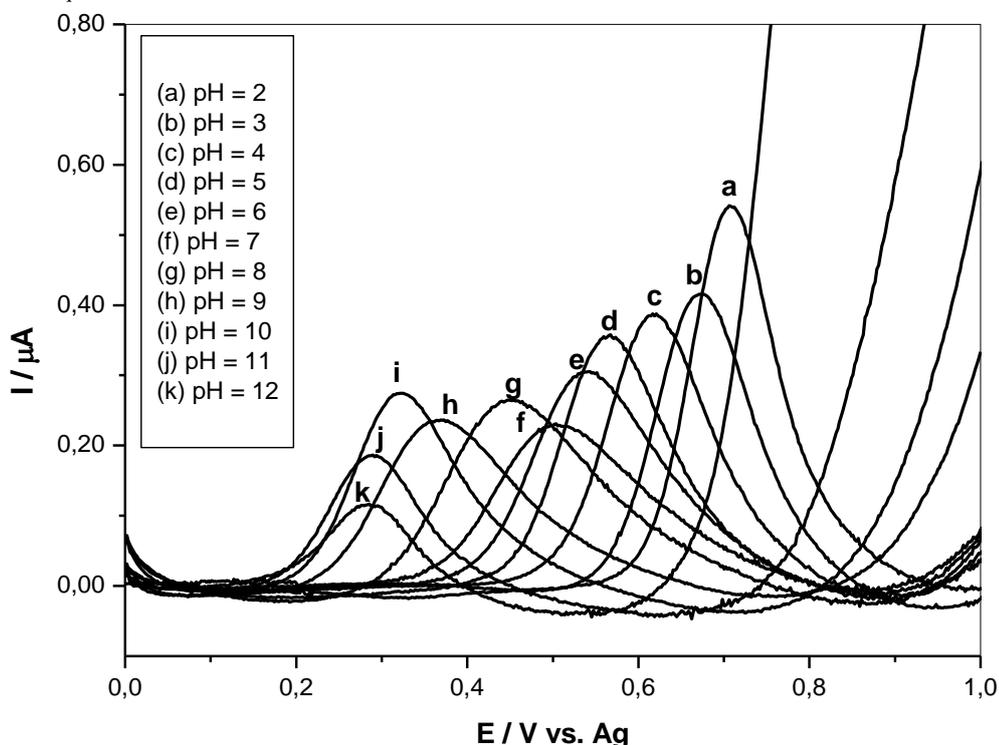
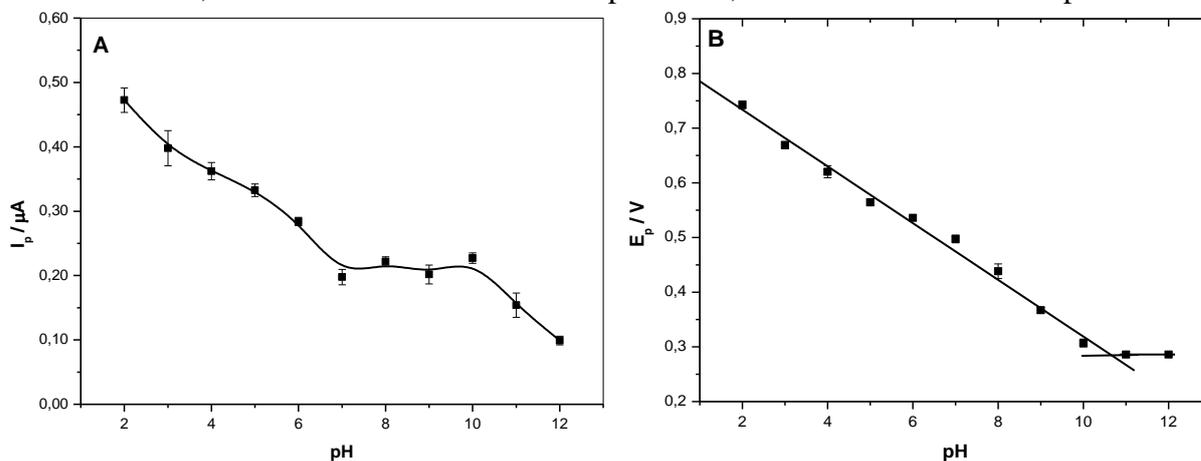


FIGURA 64: Variação da corrente (A) e potencial (B) de pico para redução eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em meio de tampão BR $0,04$ mol L⁻¹ em diferentes pHs.



Observando-se a **Figura 64B** podemos verificar que o potencial de pico desloca-se para valores negativos com o aumento do pH do meio e que apresenta duas regiões lineares: a primeira entre 2,0 e 10,0 ($E_p = 0,837 - 0,0519 \text{ pH}$) e a segunda entre 11,0 e 12,0 ($E_p = 0,286$). A interseção das duas retas na **Figura 64B** pode ser estimado o valor do pKa da dissociação

do gupo carbonila do etinilestradiol. O valor de pKa obtido experimentalmente foi de 10,6, o qual é próximo do encontrado na literatura (pKa = 10,4).

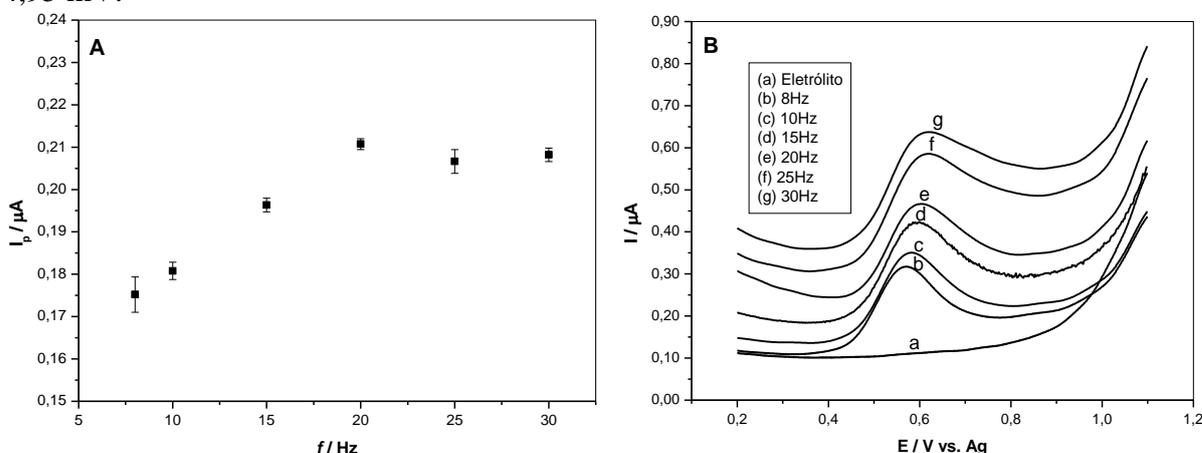
Os resultados do estudo da influencia do pH do eletrólito de suporte indicaram que o pH mais adequado para a detecção do EE2 é 6,0. Embora a corrente de pico não seja a maior, mas foi neste pH que apresentou uma melhor resolução de pico e repetitividade entres as medidas. Portanto para o desenvolvimento da metodologia foi selecionado o pH 6,0.

4.3.5.2 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VOQ

A otimização dos parâmetros da VOQ são fundamentais, pois é possível obter melhor sinal analítico e melhor perfil voltamétrico do sistema em estudo. Os parâmetros otimizados foram f , E_{sw} e o ΔE , variando-se um parâmetro em cada conjunto de experimentos.

O primeiro parâmetro otimizado foi à frequência de pulso, o estudo foi realizado no intervalo de 8 a 30 Hz. Na **Figura 65** apresenta os resultados deste estudo, observando esta figura podemos verificar que a corrente de pico aumento com o aumento da frequência até 20 Hz a partir desta frequência a corrente de pico permanece constante. Observando a **Figura 65B** onde apresenta os voltamogramas obtidos, verifica-se que a frequência de 20Hz promoveu uma boa sensibilidade, sem prejudicar o sinal analito, contudo frequências maiores provocam um aumento da linha base, um alargamento dos picos e as correntes de pico variando muito, portanto a frequência de 20Hz foi adotada para desenvolver a metodologia.

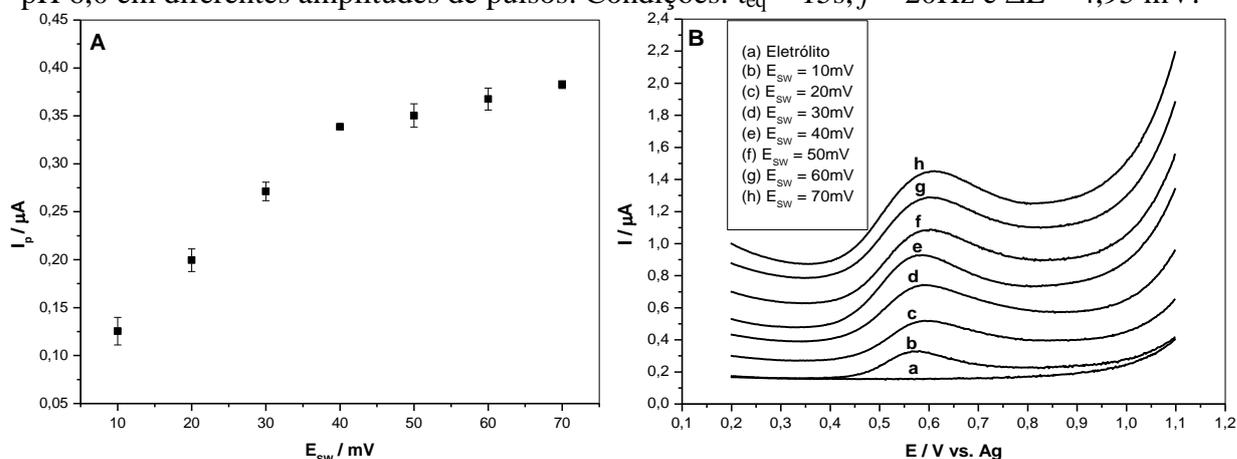
FIGURA 65: (A) Variação da corrente de pico (B) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 em diferentes frequências de pulsos. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $E_{sw} = 19,95 \text{ mV}$ e $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$.



Para o estudo da amplitude de pulso, manteve-se constante a f em 20Hz e o ΔE em 4,95mV. Foram realizadas medidas nas seguintes amplitudes: 10; 20; 30; 40; 50; 60 e 70 mV.

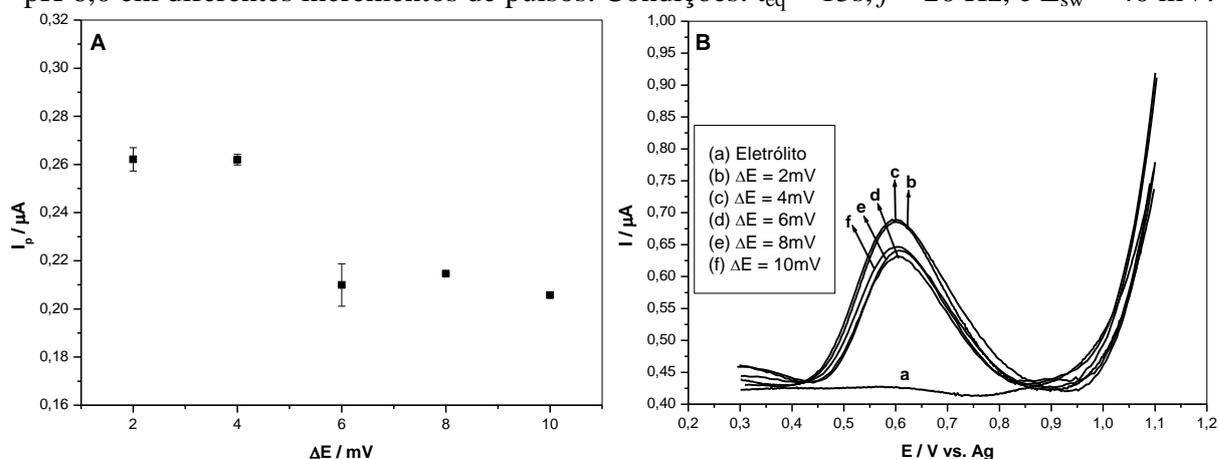
Na **Figura 66** são apresentados os resultados deste estudo. Como podemos observar na **Figura 66A** há um aumento da corrente de pico linear até a amplitude de 40mV, após este valor o aumento não é mais linear, tendendo se tornar praticamente constante. Por meio dos voltamogramas apresentados na **Figura 66B** podemos verificar que conforme aumenta a amplitude de pulso há um aumento da linha base e um pequeno alargamento do pico de oxidação do etinilestradiol. Portanto, foi selecionada a amplitude de 40 mV para prosseguir os experimentos, onde apresentou uma melhor definição dos picos e uma boa repetitividade.

FIGURA 66: (A) Variação da corrente de pico (B) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 em diferentes amplitudes de pulsos. Condições: $t_{eq} = 15\text{s}$, $f = 20\text{Hz}$ e $\Delta E = 4,95 \text{ mV}$.



O ultimo parâmetro instrumental a ser otimizado foi o incremento de potencial. O intervalo de incremento de potencial estudado foi de 2 a 10 mV, na **Figura 67** são apresentados os resultados deste estudo. Analisando-se os resultados podemos verificar que conforme aumenta o incremento de potencial há uma pequena diminuição na corrente de pico. Isso ocorre pois a cinética de difusão das espécies eletroativas é mais lenta que a velocidade de varredura, portanto em incrementos maiores, menos espécies conseguem chegar a superfície do eletrodo fazendo assim uma diminuição da corrente de pico. Com base nos resultados, foi otimizado o incremento de 4mV, pois obteve-se uma boa definição do pico e uma boa repetitividade entre as medidas.

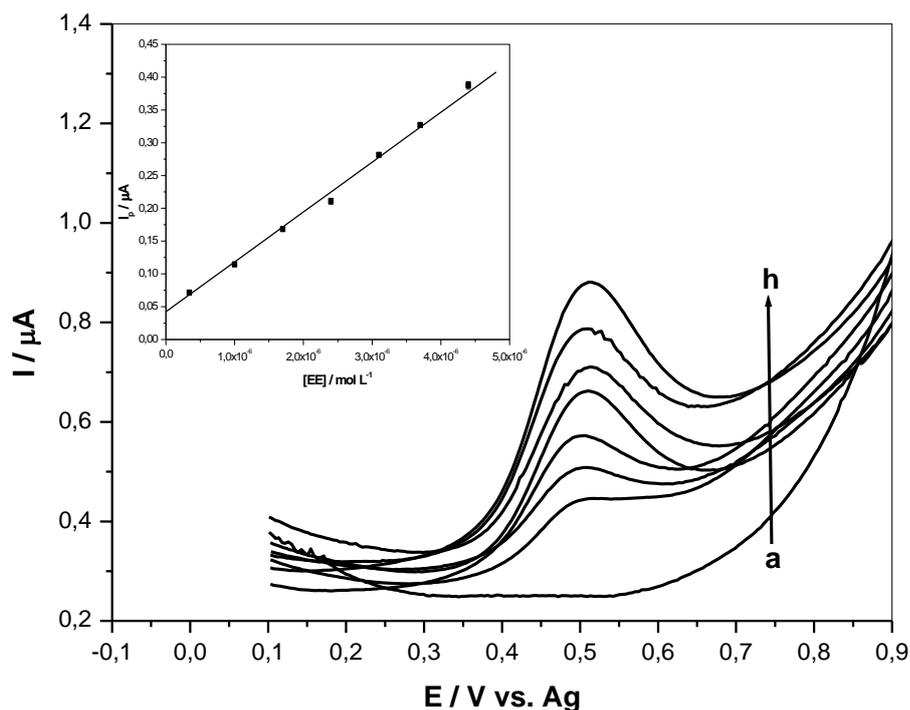
FIGURA 67: (A) Variação da corrente de pico (B) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação eletroquímica de etinilestradiol $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 em diferentes incrementos de pulsos. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, e $E_{sw} = 40 \text{ mV}$.



4.3.5.3 – CURVA ANALÍTICA

Após otimizar as condições ideais para determinação de EE2, foram registrados voltamogramas de onda quadrada no intervalo de concentração de $3,4 \times 10^{-7}$ a $4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando eletrodo impresso 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m). A partir dos voltamogramas (Figura 68) foram extraídos os valores de corrente pico e construídas as curvas analíticas, as quais foram realizadas em triplicata.

FIGURA 68: Voltamogramas de onda quadrada registrados meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 para: (a) Eletrólito de suporte, (b-h) $(0,34-4,4) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de EE2. **Inserção:** Variação da corrente pico em função da concentração de EE2. Condições: $t_{eq} = 15 \text{ s}$, $f = 20 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E = 4 \text{ mV}$.



Na **Figura 68** (Inserção) apresenta umas das curvas analíticas, e por meio das curvas pode-se determinar o LD e LQ pela **Equação 1**, os dados extraídos das curvas estão relatados na **Tabela 15**. O eletrodo modificado com PVP apresentou-se valores satisfatórios de LD e LQ, assim como uma faixa de trabalho linear que permite a determinação de baixas concentrações do analito em amostras.

TABELA 15: Parâmetros quantitativos obtidos a partir das curvas analíticas na análise de etinilestradiol por VOQ em EICG - PVP.

Parâmetros Avaliados	Curva analítica
Intervalo de concentração (mol L^{-1})	$(0,34-4,4)\times 10^{-6}$
Coefficiente linear (A)*	$4,22\times 10^{-8}$
Coefficiente angular (A L mol^{-1})*	0,07603
Coefficiente de correlação (r)*	0,9985
LD (mol L^{-1})	$3,96\times 10^{-8}$
LQ (mol L^{-1})	$1,32\times 10^{-7}$

*Média de três curvas analíticas.

Comparando os valores de LD e LQ utilizando o eletrodo impresso comercial (Capítulo II) e o eletrodo impresso fabricado (Capítulo IV), podemos verificar que os resultados foram bastante similares, justificando que o eletrodo impresso fabricado pode ser empregado com sucesso como sensor eletroquímico para os experimentos de eletroanalítica, além disso, este eletrodo é de fácil fabricação, não necessitam de materiais caros, instrumentos sofisticados ou procedimentos complexos.

4.3.5.4 – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS

Para avaliar a metodologia desenvolvida com eletrodo impresso 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m), amostras de medicamentos anticoncepcionais (amostra A e B) ambos contendo 0,03mg de etinilestradiol por comprimido foram analisadas, utilizando o método de adição de padrão.

Nas **Figuras 69 e 70** são apresentados os voltamogramas de onda quadrada registrados para a adição do medicamento (**voltamograma b**) e adições sucessivas da solução padrão do EE2 e as curvas de recuperação obtidas pelo método de adição de padrão. As curvas de recuperação mostrada na **Figura 69 e 70** (Inserção) foram realizadas em triplicata e apresentaram adequados coeficientes de correlação próximos de 0,999, mostrando a seletividade do método.

FIGURA 69: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 6,0 para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra medicamento (amostra A) com EE2 (0,035mg), (c-e) adições sucessivas da solução padrão do hormônio. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{eq} = 15s$, $f = 20$ Hz, $E_{sw} = 40$ mV e $\Delta E = 4$ mV.

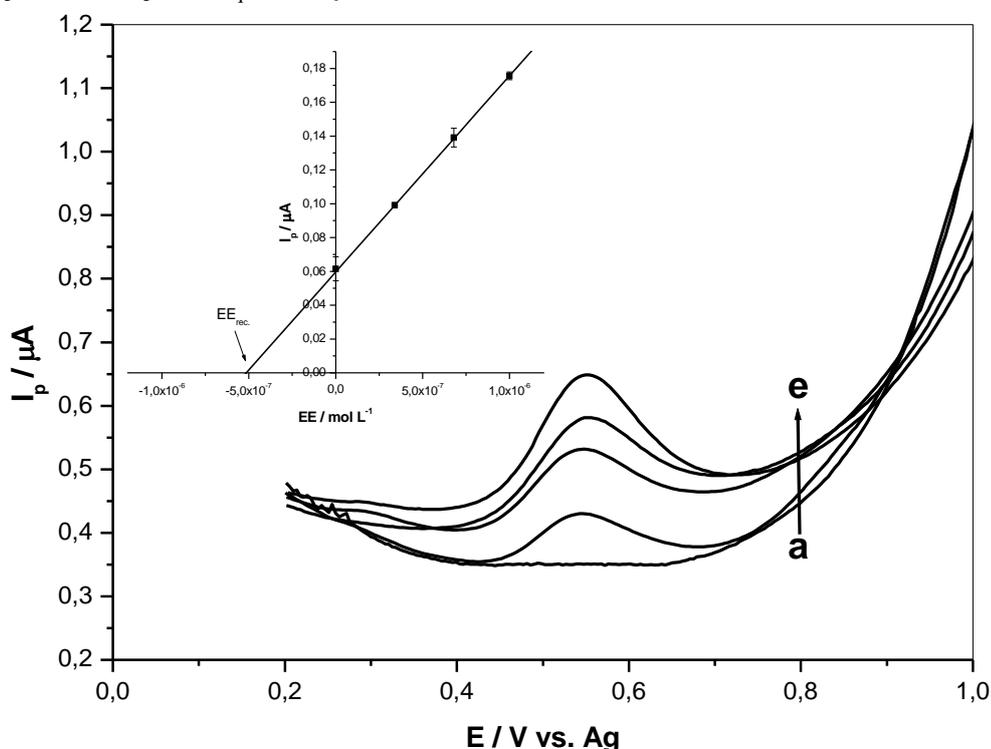
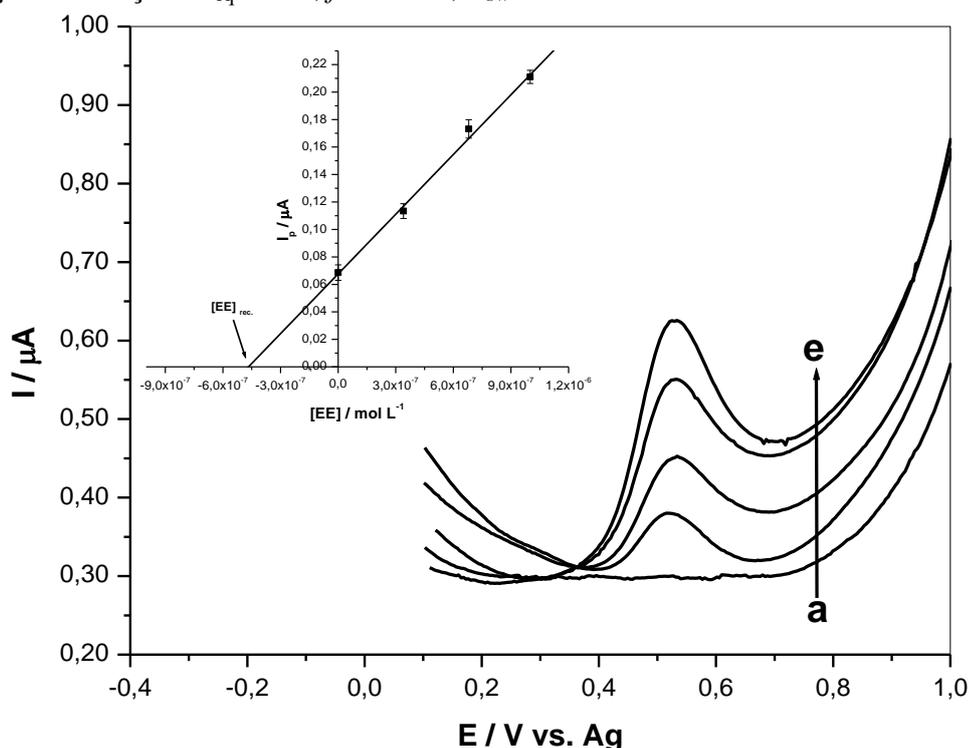


FIGURA 70: Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 6,0 para: (a) Eletrólito de suporte, (b) amostra medicamento (amostra B) com EE2 (0,035mg), (c-e) adições sucessivas da solução padrão do hormônio. **Inserção:** Curva de recuperação. Condições: $t_{eq} = 15s$, $f = 20$ Hz, $E_{sw} = 40$ mV e $\Delta E = 4$ mV.



Os resultados obtidos para análise do hormônio EE2 nas amostras de medicamentos são apresentados na **Tabela 16**. Os valores encontrados foram satisfatórios, os quais variaram entre 0,284 mg a 0,312 mg, cujos resultados mostraram que o eletrodo empregando 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) pode ser utilizado para a determinação deste hormônio em amostras de medicamentos. Além disso, os valores de desvio padrão relativo foram aceitáveis (4,04% para a amostra A e 3,61% para a amostra B). Estes resultados indicam que o eletrodo construído EICG – PVP apresentou boa precisão e exatidão e pode ser usado para determinação in-situ de forma simples, rápida, satisfatória e sem necessidade de pré- tratamento da amostra de medicamentos.

TABELA 16: Resultados dos valores encontrados para amostras de medicamentos (amostra A e B).

Medicamentos	Valor no rótulo de EE2 / mg por comprimido	Encontrado / mg por comprimido	Média ¹ / %	DPR ² / %
Amostra A	0,03	0,0284	0,0297±0,0012	4,04
		0,0297		
		0,0309		
Amostra B	0,03	0,0310	0,0305±0,0011	3,61
		0,0312		
		0,0292		

¹ Média dos valores encontrados e desvio padrão obtidos

² Desvio padrão relativo

CAPÍTULO V: Considerações finais

Os estudos realizados neste trabalho apontaram a possibilidade de determinação dos hormônios sintéticos EE2 e AC em amostras de urina e medicamento. As três metodologias eletroanalíticas desenvolvidas apresentaram bons resultados, com aceitável exatidão e precisão. Além disso, foi possível comparar os resultados obtidos de dois eletrodos impressos (comercial e o fabricado), os resultados foram bastante similares.

O uso do surfactante catiônico BCTA na primeira metodologia foi de suma importância, pois a sua presença provocou um descolamento do potencial de pico do EE2 para valores positivos, facilitando assim a determinação do analito na amostra de urina. Na segunda metodologia a presença de BCTA também foi importante, pois proporcionou a separação satisfatório dos sinais de redução dos hormônios sintéticos EE2 e AC sem comprometer a análise quantitativa, além disso, proporcionou uma maior corrente de pico e promoveu uma melhor estabilidade nas medidas eletroquímicas.

O eletrodo impresso 50/40/10 (C/P/PVP, % m/m) construído na terceira metodologia apresentou bons valores de LD e LQ, assim como uma faixa de trabalho linear que permite a determinação de baixas concentrações do analito em amostras, além disso, este eletrodo é de fácil fabricação, não necessitam de materiais caros, instrumentos sofisticados ou procedimentos complexos.

Estas metodologias são uma excelente alternativa para determinação de EE2 e EE2+AC em amostras de urina e medicamentos, pois além da facilidade de aplicação, utilizam menor volume de amostra, não usam solventes orgânicos, são precisos e eficientes quando comparados com outras técnicas analíticas.

CAPÍTULO VI: Referências bibliográficas

45 ANOS DA PÍLULA ANTICONCEPCIONAL, Disponível em: http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/pontos_vista/pontos_vista_divulgacao38-1.html acessado em 17 de fevereiro de 2016.

ANVISA, Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/> acessado em 18 de fevereiro de 2016.

ARAÚJO, A. S. A.; CARAMIT, R. P.; OLIVEIRA, L. C. S. & FERREIRA, V. S. Electroanalytical Method for Determining Pyrogallol in Biodiesel in the Presence of a Surfactant. **Electroanalysis**. 2015, 27: 1152-1158.

ARAÚJO, T.A.; BARBOSA, A.M.J.; FERREIRA, V.S.; VIANA, L.H. Voltammetric determination of tert-butylhydroquinone in biodiesel using a carbon paste electrode in the presence of surfactant. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 2010, 79 (2): 409-414.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S. & PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**. 2014, 69: 104–119.

ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; UGRINOVA, L.; STARKOSKA, K.; DJORDJEV, D. & DIMITROVSKA, A. Determination of ethinylestradiol and levonorgestrel in oral contraceptives with HPLC methods with UV detection and UV/fluorescence detection. **Macedonian pharmaceutical bulletin**. 2006, 52 (1,2): 9-16.

BARBOSA, A. M. J.; ARAUJO, T. A.; TRINDADE, M. A. G. & FERREIRA, V. S. Direct cefepime determination in human milk using solid mercury amalgam electrode manufactured with silver nanoparticles. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 2012, 681: 127-132

BARD, A. J. & FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. **Wiley**, 2000.

BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A. & HEER, W. A. Carbon nanotubes their route toward applications. **Science**. 2002, 297: 787-792.

BEHPOUR, M.; ATTARAN, A. M.; SADIANY, M. M. & KHOOBI, A. Adsorption effect of a cationic surfactant at carbon paste electrode as a sensitive sensor for study and detection of folic acid. **Measurement**. 2016, 77: 257-264.

BELTAGI, A. M. Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2003, 31: 1079-1088.

BENITESA, T. A.; RIBEIROA, W. C.; GÓESB, M. S.; FERREIRA, A. A. P. & BUENOA, P. R. Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. **Química nova**. 2014, 37 (9): 1533-1537.

CABRAL, M. F.; SOUZA, D.; ALVES, C. R.; MACHADO S. A. S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Ecletica Química**. 2003, 28 (3): 41-47.

CALIXTO, C. M. F., CERVINI, P & CAVALHEIRO, E. T. G. Eletrodo compósito à base de grafite-araldite[®]: aplicações didáticas. **Química Nova**. 2008, 31 (8): 2194-2198.

CARAMIT, R. P.; ANDRADE, A. G. F.; SOUZA, J. B. G.; ARAÚJO, T. A.; VIANA, L. H.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed Electrodes. **Fuel**. 2013, 105: 306-313.

CHEMICALIZE. Disponível em: <https://chemicalize.com>, acessado em 09 de agosto de 2017.

CLOUZOT, L.; MARROT, B.; DOUMENQ, P & ROCHEA, D. 17 α -ethinylestradiol: an endocrine disrupter of great concern. analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. **Environmental Progress**. 2008, 27 (3): 383-396.

DANTAS, A. N. S.; SOUZA, D.; LIMA, J. E. S.; LIMA-NETO, P. & CORREIRA, A. N. Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode. **Electrochimica Acta**. 2010, 55: 9083-9089.

EL-ENANY, N.; EL-SHERBINY, D. & BELAL, F. Voltammetric determination of cyproterone acetate in pharmaceutical preparations. **International Journal of Biomedical Science**. 2010, 6 (2): 128-134.

FRANZOI, A. C.; SPINELLI, A. & VIEIRA, I. C. Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poly(vinylpyrrolidone). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2008, 47: 973-977.

FREIRE, A. B. A.; CARNEVALLI, T. B.; SILVEIRA, T. S. & ZARATIN, A. C. M. Comparação do perfil lipídico de usuárias e não-usuárias de contraceptivos orais combinados (COCS). **Cadernos de Pesquisa**. 2011, 3 (3): 130-146.

GHONEIM, E. M.; H.S. EL-DESOKY, H. S. & GHONEIM, M.M. Adsorptive cathodic stripping voltammetric assay of the estrogen drug ethinylestradiol in pharmaceutical formulation and human plasma at a mercury electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2006, 40: 255-261.

GHONEIM, M. M.; TAWFIK, A. Assay of anti-coagulant drug warfarin sodium in pharmaceutical formulation and human biological fluids by square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**. 2004, 511, 63-69.

GHONEIM, M. M.; ABUSHOFFA, A. M.; Y.I. MOHARRAMA, Y. I. & EL-DESOKY, H.S. Voltammetry and quantification of the contraceptive drug norethisterone in bulk form and pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2007, 43: 499-505.

GHONEIM, M. M; BAUMANN, W.; HAMMAMA, E. & TAWFIK, A. Voltammetric behavior and assay of the contraceptive drug levonorgestrelin bulk, tablets, and human serum at a mercury electrode. **Talanta**. 2004, 64: 857-864.

HE, Q., DANG, X., HU, C. & HU, S. The effect of cetyltrimethyl ammonium bromide on the electrochemical determination of thyroxine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 2004, 35: 93-98.

HERTER, L. D. & ACCETTA, S. G. Anticoncepção e gestação na adolescência. **Jornal de Pediatria**. 2001, 77 (2): 170-178.

HUANG, W. Voltammetric Determination of Bisphenol A Using a Carbon Paste Electrode Based on the Enhancement Effect of Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB). **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 2004, 26 (10): 1560-1564.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2013: Ciclos de vida: Brasil e grandes regiões, Coordenação de Trabalho e Rendimento - Rio de Janeiro: 2015.

JESUS, V. O.; BARBOSA, A. M. J.; PETRONI, J. M.; LUCCA, B. G. & FERREIRA, V. S. Voltammetric determination of herbicide molinate in river water and rice samples using solid silver amalgam electrode fabricated with nanoparticles. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. 2017, 97 (5): 468-483.

JUNIOR, O. P. A.; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. & VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de pesquisa**. 2001, 12: 116-131.

LI CHUNYA. Voltammetric determination of ethinylestradiol at a carbon paste electrode in the presence of cetyl pyridine bromine. **Bioelectrochemistry**, 2007, 70: 263-268.

LIU, Z.; OGEJO, J. A.; PRUDEN, A & KNOWLTON, K. F. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. **Science of the Total Environment**. 2011, 409: 5149-5161.

LOBO, R. A. & ROMÃO, F. Hormonas sexuais femininas e trombose venosa profunda. **Angiologia e Cirurgia Vascular**. 2011, 7 (4): 208-214.

LOVRIC, M.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; MURRAY, W. R. Adsorption effects in square-wave voltammetry of totally irreversible redox reactions. **Eletrochimica Acta**. 1988, 33(6): 739-744.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**. 2001, 24 (1): 87-93.

MANUAL DE ANTICONCEPÇÃO, Disponível em: <http://www.anticoncepcao.org.br/>, acesso em 18 de fevereiro de 2016.

MARTÍNEZ, N. A.; PEREIRA, S. V.; BERTOLINO, F.A.; SCHNEIDER, R.J.; MESSINA, G.A. & RABA, J. Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. **Analytica Chimica Acta**. 2012, 723: 27-32.

MENDONÇA, R. X, BUZZATTI, P. H. M., SILVA, A. L., ARAÚJO, A. S., PONZIO, E. A. & SEMAAN, F. S. Determinação voltamétrica de citrato de sildenafil e furosemida utilizando eletrodo compósito grafite-parafina para aplicação em amostras de interesses farmacêutico e toxicológico. **Revista Virtual de Química**. 2015, 7 (5): 1692-1708.

MIKKELSEN, O. & SCHRODER, K. H. Amalgam electrodes for electroanalysis. **Electroanalysis**. 2003, 15 (8): 679-687.

MISTRY, K. K.; DEEPHY, S. D.; CHAUDHURI, C. R. & SAHA, H. Electrochemical characterization of some commercial screen-printed electrodes in different redox substrates. **Current science**, 2015, 109 (8): 1427-1436.

MOHAMED, H. M. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. **Trends in Analytical Chemistry**. 2016, 82: 1-11.

MSIGALA, S. C., MABIKI, F. P., STYRISHAVE, B., & MDEGELA, R. H. Optimized HPLC-UV method for separation, detection and quantification of endocrine disrupting estrogens in low quality water. *International Journal of Chemistry*. 2017, 9 (3): 19-27.

NASCIMENTO, V. B. & ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "SILK-SCREEN". **Química Nova**. 1998, 21 (5): 614-629.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. 2002, 25: 772-776.

NUNES, C. N.; PAULUK, L. E.; FELSNER, M. L.; ANJOS, V. E. & QUINÁIA, S. P. Rapid screening method for detecting ethinyl estradiol in natural water employing voltammetry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. 2016.

PATEL, M. G. & SAGAR, G. V. Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of ethinylestradiol and cyproterone acetate in combined solid dosage form. **International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences**. 2012, 2 (3): 611-622.

PEREIRA, A. C., SANTOS, A. S. & KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**. 2002, 25 (6): 1012-1021.

PEREZ, C.; SIMÕES, F. R. & CODOGNOTO, L. Voltammetric determination of 17 α -ethinylestradiol hormone in supply dam using BDD electrode. **Journal solid state electrochem**. 2016, 20 (9): 2471-2478.

PETRONI, J. M.; LUCCA, B. G.; FOGLIATO, D. K. & FERREIRA, V. S. Sensitive approach for voltammetric determination of carbendazim based on the use of an anionic surfactant. **Electroanalysis**. 2016, 28: 1-9.

PÍLULAS ANTICONCEPCIONAIS, Disponível em: <http://gpquae.iqm.unicamp.br/>, acesso em 18 de fevereiro de 2016.

PIOVESAN, J. V. & SPINELLI, A. Determination of quercetin in a pharmaceutical sample by square-wave voltammetry using a poly(vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrode. **Journal of Brazilian Chemical Society**. 2014, 25 (3): 517-525.

RENEDO, O. D.; ALONSO-LOMILLO, M. A. & MARTÍNEZ, M. J. A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. **Talanta**. 2007, 73: 202-219.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R. & MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química nova**. 2009, 32 (2): 518-521.

SHRIVASTAVA, A. & GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification on the analytical methods. **Chronicles of Young scientists**. 2011, 2 (1): 21-25.

SILVA, V. B.; GALDOS, A. A. G.; MOTHE, C. M. A.; PALLASTRELLI, M. B.; PRADO, M. S. A.; SINGH, A. K.; KEDORHACKMANN, E. R. M. & SANTORO, M. I. R.M. Simultaneous determination of ethinyl estradiol and drospirenone in oral contraceptive by high performance liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2013, 49: 251-256.

SOURI, E.; JALALIZADEH, H.; FARSAFAM, H.; GHADIRI, R. & AMANLOU, M. Simultaneous determination of cyproterone acetate and ethinylestradiol in tablets by derivative spectrophotometry. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. 2005, 53: (8) 949-951.

SOUZA FILHO, A. G. & FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**. 2007, 30 (7): 1695-1703.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. & AVACA, L.A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. **Química Nova**. 2003, 26 (1): 81-89.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**. 1997, 20 (2): 191-195.

SHRIVASTAVA, A. & GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification on the analytical methods. **Chronicles of Young scientists**. 2011, 2 (1): 21-25.

SZYMULA, M.; NARKIEWICZ-MICHALEK, J. The effect of surfactant adsorption at a glassy carbon electrode on electrochemical oxidation of propyl gallate. **Journal of Applied Electrochemistry**. 2006, 36: 455-462.

TRINDADE, M. A. G. Métodos eletroanalíticos e cromatográficos aplicados na Análise de corantes usados como marcadores em combustíveis. 2009. 195 f.. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

TWADDLE, N.C.; CHURCHWELL, M.I.; NEWBOLD, R.R.; DELCLOS, K.B. & DOERGE, D.R. Determination using liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectroscopy of ethinylestradiol serum pharmacokinetics in adult Sprague-Dawley rats, **Journal of Chromatography B**. 2003, 793: 309-315.

VITTAL, R.; H. GOMATHI, H. & KIM, K.-J. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes. **Advances in Colloid and Interface Science**. 2006, 119: 55-68.

WANG, P., CAN, T., ZHANG, J., LUO, J. & ZHANG, S. Polyvinylpyrrolidone-enhanced electrochemical oxidation and detection of acyclovir. **Journal of Molecular Liquids**. 2013, 177: 129-132.

WANG, Y., YAO, G., TANG, J., YANG, C., XU, Q. & HU, X. Online coupling of lab-on-valve format to amperometry based on polyvinylpyrrolidone-doped carbon paste electrode and its application to the analysis of morin. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. 2012.

WANNMACHER, L. Anticoncepcionais Oraís: o que há de novo. **Uso racional de medicamentos**. 2003, 1 (1): 1-6.

WENKUI LI, W.; LI, Y. H.; LI, A. C.; ZHOU, S. & NAIDONG, W. Simultaneous determination of norethindrone and ethinyl estradiol in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry-experiences on developing a highly selective method using derivatization reagent for enhancing sensitivity. **Journal of Chromatography B**. 2005, 825: 223-232.

XIE, P. & YANG, C. Studies on Enhanced Oxidation of Estrone and Its Voltammetric Determination at Carbon Paste Electrode in the Presence of Cetyltrimethylammonium Bromide. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 2007, 28 (10): 1729-1734.

YAN, X., WANG, F. & HU, S. The electrochemical oxidation of troxerutin and its sensitive determination in pharmaceutical dosage forms at PVP modified carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 2006, 52: 8-13.

YANG, X., SUN, D., XIE, X. & ZHANG, H. Sensitive and rapid determination of nifedipine using polyvinylpyrrolidone-modified carbon paste electrode. **Journal of Electrochemistry**. 2014, 50 (5): 453-457.

YOSYPCHUK, B. & NOVOTNY, L. Cathodic stripping voltammetry of cysteine using silver and copper solid amalgam electrodes. **Talanta**. 2002, 56: 971-976.

YOSYPCHUK, B. & NOVOTNY, L. Nontoxic electrodes of solid amalgams. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. 2002, 32 (2):141-151.

YOSYPCHUK, B. & SESTÁKOVÁ, I. Working electrodes from amalgam paste for electrochemical measurements, **Electroanalysis**. 2008, 20 (4): 426-433.

YOSYPCHUK, O; KARÁSEK, J.; VYSKOCIL, V.; BAREK, J. & PECKOVÁ, K. The use of silver solid amalgam electrodes for voltammetric and amperometric determination of nitrated polyaromatic compounds used as markers of incomplete combustion. **The ScientificWorld Journal**. 2012. 1-12.

ZARBIN, A. J. G. & OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): quo vadis? **Química Nova**. 2013, 36 (10): 1533-1539.

ZHANG, S., SHI, Z. & WANG, J. Sensitive and rapid determination of quinoline yellow in drinks using polyvinylpyrrolidone-modified electrode. **Food Chemistry**. 2015, 173: 449-453.