



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAFAEL RIBEIRO PORTELA

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS DIETILESTILBESTROL E
METILDOPA**

FORTALEZA
2013

RAFAEL RIBEIRO PORTELA

ESTUDO ELETROQUÍMICO E DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS DIETILESTILBESTROL E
METILDOPA

Tese de Doutorado apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química com ênfase em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Lima Neto.

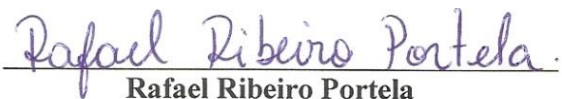
FORTALEZA

2013

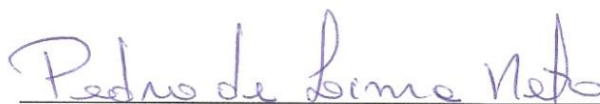
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

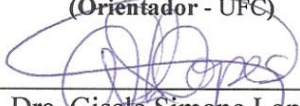
-
- P877e Portela, Rafael Ribeiro.
Estudo eletroquímico e desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação dos fármacos dietilestilbestrol e metildopa / Rafael Ribeiro Portela. – 2013.
142 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Química Analítica e Físico Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Química Analítica.
Orientação: Prof. Dr. Pedro de Lima Neto.
1. Voltametria cíclica. 2. Mecanismo redox. 3. Farmacos. I. Título.

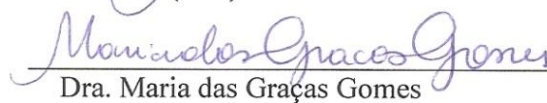
Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

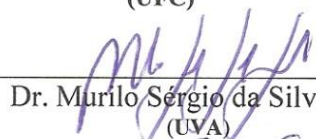

Rafael Ribeiro Portela

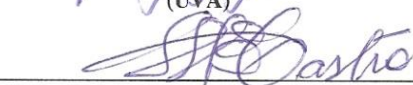
Tese aprovada em: 26/04/2013


Dr. Pedro de Lima Neto
(Orientador - UFC)


Dra. Gisele Simone Lopes
(UFC)


Dra. Maria das Graças Gomes
(UFC)


Dr. Murilo Sérgio da Silva Julião
(UVA)


Dra. Suely Souza Leal de Castro
(UERN)

A minha mãe, Ana Maria, por ter me ensinado a nunca desistir.

Agradecimentos

A Deus, por escutar minhas preces e acalmar minha alma nos momentos de angustias e dificuldades, e por permitir que eu tenha sucesso em minhas escolhas.

A minha família, por apoiar minhas escolhas e compreender minha ausência durante esta jornada.

A UFC, pela estrutura que possibilitou minha formação intelectual, por todo o aprendizado técnico, científico e humano e por ser a extensão da minha casa de realização deste curso.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES-REUNI), pelo apoio financeiro concedido.

Ao Instituto Federal do Ceará, pelo apoio concedido para que eu concluí-se minhas atividades de tese.

Ao professor Pedro de Lima Neto, pela orientação e por todos os ensinamentos passados ao longo desses anos em que trabalhamos juntos e compreensão no momento em que necessitei me afastar um pouco de minhas atividades de pesquisa.

As professoras: Adriana Nunes Correia, Elisane Longhinotti e Gisele Simone Lopes, pela contribuição, críticas e elogios que colaboraram para a melhoria do material produzido.

Aos professores: Murilo Sergio, Suely Souza, Maria das Graças e Gisele Lopes pelas contribuições dadas neste trabalho e pela aprovação final consedida.

A professora Helena pelo apoio, pelos ensinamentos e por ceder espaço em seu laboratório para que eu pudesse fazer as medidas de UV-Vis.

Agradecimento especial ao amigo Leandro que muito colaborou para a conclusão do trabalho, me ajudando com os cálculos quânticos que possibilitaram ótimos resultados, além do seu companheirismo e paciência em me ajudar.

Ao amigos do grupo de eletroquímica atual GELCORR (será que lembro de todos): Ionete, Regilane, Regina, Gustavo, Roger, Regis, Paulo Sergio, Milton, Leandro, Wirley, Célia, Sanderlir, Cristiane, Josenir, Naftali, Amanda, Othon, Vanessa, Luanna, Allan, Sâmeque, pela grande amizade, não apenas nas horas boas, mas principalmente nos momentos difíceis sempre dando incentivo e apoio, além das colaborações dadas à minha pesquisa e formação.

Agradecimento mais que especial à Nathalie que, agora mais que nunca, faz parte da minha vida e esteve sempre pronta a me dar incentivo nesta dura jornada de altos e baixos que enfrentamos todos os dias.

E a todas as outras pessoas que por esquecimento não foram citadas (desculpa pessoal, depois de 11 anos é muita gente pra lembrar) contribuíram para que tudo desse certo.

“Ser feliz não é, necessariamente, ter tudo que se quer, mas certamente é saber enxergar a beleza que existe em tudo que se tem”.

RESUMO

Neste trabalho, foram feitos estudos eletroquímicos e analíticos, utilizando voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, e de modelagem computacional, utilizando o *software* DMOL³ e *forcite*, para as moléculas de dietilestilbestrol (DES) e metildopa (MDP). Os estudos eletroquímicos e analíticos foram feitos sobre superfície de carbono vítreo e utilizando tampão BR como eletrólito suporte. Para o DES, estudos preliminares mostraram um pico anódico e um catódico, em torno de 0,450 V e 0,021 V, respectivamente. O potencial de pico do DES deslocou-se para valores mais negativos com o aumento do pH e a corrente de pico apresentou um valor máximo em pH 7. O processo redox foi controlado por adsorção e caracterizou-se como catalítico com transferência irreversível de carga. Modelos computacionais mostraram que as densidades eletrônicas dos orbitais HOMO se localizam principalmente sobre os oxigênios dos grupos fenóis e apresentaram cargas de Mulliken de -0,507, sendo os prováveis sítios de oxidação do DES. Cálculos de adsorção indicaram adsorção física do DES com valores de energia variando de -30 a -33 kcal mol⁻¹. Por fim, o mecanismo calculado mostrou-se de acordo com a proposta obtida eletroquimicamente, com a formação de uma quinona. Para a determinação analítica os parâmetros da VOQ otimizados foram $f = 80$ Hz, $a = 30$ mV, $\Delta E = 4$ mV. Curvas analíticas foram feitas, e calculados o LD = $5,58 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (14,9 ppb) e LQ = $1,89 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (49,9 ppb). A repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas através do RSD, obtendo-se valores de 1,64% e 3,47%, respectivamente. A metodologia foi aplicada em formulação farmacêutica, água natural e urina sintética, obtendo-se recuperações de 94,32%, 77,85%, 89,00%, respectivamente. Para a MDP os estudos voltamétricos mostraram um processo anódico e um catódico em pH 2 e 3 e apresentou dois picos anódicos e um catódico em pHs maiores que 3. Foi observada uma dependência dos potenciais de pico que se deslocaram para valores mais negativos como aumento do pH. Estudos de velocidade de varredura mostraram que o processo é controlado por adsorção e aplicando os critérios de Nicholson-Shain o processo redox foi classificado como catalítico com transferência irreversível de carga. Em pHs acima de 3 foi observado um processo irreversível com formação de filme polimérico na superfície do eletrodo. Em pH abaixo de 3 o processo apresentou um caráter reversível. Cálculos quânticos e de carga de Mulliken mostraram que a densidade eletrônica dos orbitais HOMO e LUMO estão principalmente sobre os oxigênios fenólicos e uma possível rota reacional com formação de dímeros, e possível polimerização, é energeticamente viável confirmando o mecanismo proposto. A metodologia eletroanalítica foi desenvolvida também utilizando VOQ em meio de tampão BR pH 2 e os parâmetros otimizados foram: $f = 20$ Hz, $a = 20$ mV, $\Delta E = 2$ mV. Curvas analíticas foram obtidas e a partir destas calculados o LD e LQ de $6,32 \times 10^{-9}$ (1,33 ppb) e $2,10 \times 10^{-8}$ (4,43 ppb), respectivamente. A repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas através do RSD, obtendo-se valores de 3,01% e 4,96%, respectivamente. A metodologia foi aplicada em formulação farmacêutica, água natural e urina sintética, obtendo-se recuperações de 93,32%, 97,03%, 91,29%, respectivamente. Sendo assim, as metodologias propostas mostraram-se adequadas para determinação dos fármacos estudados.

Abstract

In this work, electrochemical and analytical studies were performed, using cyclic voltammetry, square wave voltammetry, and computational modeling using the software DMOL³ and forcite, for diethylstilbestrol (DES) and methyldopa (MDP) molecules. The electrochemical and analytical studies was carried out on the glassy carbon surface and using BR buffer as electrolyte. For DES preliminary studies showed a anodic and cathodic peak about 0,450 V and 0,021 V, respectively. The DES's peak potential shifted to more negative values with pH increasing and the peak current showed maximum at pH 7. The redox process presented an adsorptive control and was characterized as catalytic with irreversible charge transfer. Computer models showed that electron densities of the HOMO orbital is mainly located on the oxygens phenols groups and presented Mulliken charges of -0.507, thus, these are probable DES oxidation sites. Calculations indicate physical adsorption of DES with energy values shifted from -30 to -33 kcal mol⁻¹. Finally, the theoretical mechanism was shown to be in accordance with the proposal electrochemically, with the formation of a quinone. For the analytical determination the VOQ parameters were optimized: $f = 80$ Hz, $\nu = 30$ mV, $\Delta E = 4$ mV. Curves were made, and the calculated LD = 5.58×10^{-8} mol L⁻¹ (14.9 ppb) and LQ = 1.89×10^{-7} mol L⁻¹ (49.9 ppb). The repeatability and reproducibility were evaluated by the RSD, giving values of 1.64% and 3.47%, respectively. The methodology was applied in pharmaceutical formulation, natural water and synthetic urine, resulting in recoveries of 94.32%, 77.85%, 89.00%, respectively. For MDP voltammetric studies showed an anodic and cathodic process at pH 2 and 3. At pH values larger than 3 showed two anodic peaks and a cathodic. Was observed a dependence of peak potentials that have shifted to more negative values with increasing the pH. Sweep speed studies showed that the process is controlled by adsorption and applying the Nicholson-Shain criteria redox process was classified as catalytic irreversible charge transfer. At pHs above 3 was observed an irreversible process with formation of polymeric film on the electrode surface. At pH below 3 the process showed a reversible character. And quantum chemical calculations showed that Mulliken charge density of the electron orbitals HOMO and LUMO are primarily on the phenolic oxygens and one possible reaction route with dimer formation and possible polymerization is energetically possible, confirming the mechanism proposal. The electroanalytical methodology had also been developed using VOQ, and BR buffer pH 2 as electrolyte and VOQ parameters were optimized: $f = 20$ Hz, $\nu = 20$ mV, $\Delta E = 2$ mV. Curves were obtained, and calculated LD and LQ of 6.32×10^{-9} (1.33 ppb) and 2.10×10^{-8} (4.43 ppb), respectively. The repeatability and reproducibility were evaluated by the RSD, giving values of 3.01% and 4.96%, respectively. The methodology was applied in pharmaceutical formulation, natural water and synthetic urine, resulting in recoveries of 93.32%, 97.03%, 91.29%, respectively. Thus, this methodology can be employed with success for pharmaceutical formulation determination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação estrutural do dietilestilbestrol.	25
Figura 2 - Esquema ilustrativo da atuação de uma molécula de desregulação endócrina, com os efeitos agonista e antagonistas.	26
Figura 3 - Representação estrutural da metildopa (MDP).	33
Figura 4 - Desenho esquemático da célula eletroquímica utilizada no trabalho experimental.	43
Figura 5 - Voltamogramas cíclicos (A) e Voltamogramas de onda quadrada (B) para DES $1,9 \times 10^{-5}$ sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ todos em pH 7,0 e tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0. (A) $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, (B) $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	53
Figura 6 - Relação entre a corrente de pico versus o pH para a oxidação do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo.	55
Figura 7 - A) Gráfico de pH versus α para a molécula de DES, obtido a partir dos cálculos computacionais. B) Estruturas do DES em função do pH do meio.	57
Figura 8 - Relação entre a corrente de pico contra o pH para a oxidação do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo.	58
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos para 15 ciclos consecutivos de oxiredução do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo.	59
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos para o DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo, variando o potencial de inversão no sentido anódico de: 0,1 V a 1,0 V.	61
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos para o DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo, variando o potencial de inversão no sentido catódico de: 0,2 V a -0,4 V.	62

Figura 12 - A) Voltamogramas cíclicos referentes ao 1º ciclo e variando a velocidade de varredura de 10 a 500 mV s ⁻¹ para a oxiredução do DES 1,9 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo. B) Relação ente a potencialde pico e a velocidade de varredura para o DES em meio de tampão BR pH7.	63
Figura 13 - Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura, para o DES em tampão BR pH 7,sobre superfície de carbono vítreo.....	65
Figura 14 - Correlação entre a função corrente (Ip/v ^{1/2}) e a velocidade de varredura (v) para os processo de oxidação e redução da molécula deDES sobre superfície de carbono vítreo.....	65
Figura 15 - Orbitais HOMO -1 e HOMO para a molécula de DES.....	67
Figura 16 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de DES.	68
Figura 17 - Representação da estrutura tridimensional geometrizada da molécula de DES em duas perspectivas diferentes.	69
Figura 18 - (A) Estrutura do DES adsorvida sobre a superfície de grafeno. (B) Cálculo da energia de adsorção da molécula de DES.....	70
Figura 19 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de DES radicalar.....	71
Figura 20 – Representação da estrutura tridimensional geometrizada da molécula de DES.	72
Figura 21 - Variação de energia das estruturas do DES em cada etapa do mecanismo redox.....	73
Figura 22 - Proposta de mecanismo redox do DES em meio de Tampão BR pH 7.	74
Figura 23 - Voltamograma de onda quadrada para oxidação do DES 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ sobre carbono vítreo, em diferentes frequências de aplicação de pulsos em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ . a = 50 mV, ΔEs = 2 mV.	77
Figura 24 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do DES 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ sobre carbono vítreo, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7), em	

	diferentes amplitudes de pulso de potencial na faixa de 10 a 50 mV .(B): Relação entre a corrente de pico e a amplitude de pulso. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s =$ 2mV.	79
Figura 25 -	(A) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação do DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes incrementos de varredura. (B): Relação entre I_p e o ΔE_s . $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$	80
Figura 26 -	Componentes de corrente para o DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	82
Figura 27 -	Comportamento voltamétrico da componente reversa no estudo da variação da amplitude de pulso de potencial para a oxidação do DES sobre carbono vítreo em meio de Tampão BR (pH 7).	83
Figura 28 -	Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em concentrações variando de $1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,67 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	84
Figura 29 -	Curva analítica para DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir dos valores médios ($n = 5$) das correntes de pico com concentração variando de $1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,67 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com suas respectivas barras de desvio padrão, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$	85
Figura 30 -	A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 5$). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	90
Figura 31 -	A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em formulação farmacêutica. B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a	

	partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico (n = 5). f = 80 s ⁻¹ , a = 30 mV, ΔEs = 4 mV.....	92
Figura 32 - A)	Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de urina sintética. B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico (n = 5). f = 80 s ⁻¹ , a = 30 mV, ΔEs = 4 mV.	93
Figura 33 - A)	Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ . B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico (n = 5). f = 80 s ⁻¹ , a = 30 mV, ΔEs = 4 mV.....	95
Figura 34 - A)	Espectros de UV-Vis para o padrão de DES em meio aquoso no intervalo de concentração de: 3,0 x 10 ⁻⁷ a 9,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . B) Curva analítica do DES obtida a partir dos experimentos de UV-Vis.	96
Figura 35 -	Voltamogramas cíclicos referente à oxirredução da metildopa em meio de Tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pHs 2 a 9) sobre superfície de carbono vítreo. ...	99
Figura 36 -	Relação entre a corrente de pico contra o pH para a oxidação do MDP 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ sobre superfície de carbono vítreo.	101
Figura 37 -	Relação entre a corrente de pico contra o pH para a oxidação do DES 1,9x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ sobre superfície de carbono vítreo.....	102
Figura 38 -	Voltamogramas cíclicos para 15 ciclos consecutivos de oxiredução do MDP 1,9 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2 (A) e 7(B) sobre superfície de carbono vítreo.....	103
Figura 39 -	Voltamogramas cíclicos para 15 ciclos consecutivos de oxiredução do MDP 1,9 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo.....	104

Figura 40 - Proposta de mecanismo redox para a MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR (pH 7).	105
Figura 41 - (A) Voltamogramas cíclicos referentes à variação da velocidade de varredura de 10 a 500 mV s ⁻¹ para a oxiredução do MDP 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo. (B) Relação ente a corrente de pico e a velocidade de varredura para o MDP em meio de tampão BR pH7.....	106
Figura 42 - Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura, para o DES em tampão BR pH 7,sobre superfície de carbono vítreo.....	107
Figura 43 - Correlação entre a função corrente (I _p /v ^{1/2}) e a velocidade de varredura (v) para a oxirredução da MDP sobre superfície de carbono vítreo.....	108
Figura 44 - A) Gráfico de α versus pH para a molécula de MDP, obtido a partir experimentos teóricos. B) Estruturas da MDP em função do pH do meio.	109
Figura 45 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de MDP em duas perspectivas	111
Figura 46 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de MDP em duas perspectivas.	112
Figura 47 - Representação da estrutura tridimensional geometrizada da molécula de DES em duas perspectivas diferentes.	113
Figura 48 - Variação de energia das estruturas da MDP em cada etapa do mecanismo redox.....	114
Figura 49 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do MDP 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ sobre carbono vítreo, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 2), em diferentes frequências de pulso de potencial na faixa de 8 a 70 s ⁻¹ .(B): Relação entre a corrente de pico e a frequência de pulso de potencial. f = 20 s ⁻¹ , ΔEs = 2 mV.	116
Figura 50 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do MDP 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ sobre carbono vítreo, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ (pH 2), em diferentes amplitudes de pulso de potencial na faixa de 10 a 50 mV .(B):	

	Relação entre a corrente de pico e a amplitude de pulso. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	117
Figura 51 - (A)	Voltamogramas de onda quadrada para oxidação da MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), em diferentes incrementos de varredura. (B): Relação entre I_p e o incremento de varredura. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$	119
Figura 52 -	Componentes de corrente para o MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	120
Figura 53 -	Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em concentrações variando de $4,97 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a $4,76 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	121
Figura 54 -	Curva analítica para MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir dos valores médios ($n = 5$) das correntes de pico com concentração variando de $4,97 \times 10^{-8}$ a $4,76 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. , com suas respectivas barras de desvio padrão, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2.....	122
Figura 55 - A)	Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 5$). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	126
Figura 56 - A)	Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 3$). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	127
Figura 57 -	Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em urina sintética. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir	

da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 3$). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ 128

Figura 58 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em água natural. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 3$). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ 129

Figura 59 - A) Espectros de UV-Vis para o padrão de MDP em meio aquoso no intervalo de concentração de: $7,40 \times 10^{-7}$ a $3,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva analítica do DES obtida a partir dos experimentos de UV-Vis. 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de reagentes analíticos utilizados com as respectivas procedências...40	40
Tabela 2 - Composição da solução de urina sintética.....50	50
Tabela 3 - Valores das cargas de Mulliken calculadas para os átomos numerados na estrutura.....69	69
Tabela 4 - Valores das cargas de Mulliken calculadas para os átomos da molécula de DES radicalar.....72	72
Tabela 5 - Resultados obtidos a partir das curvas analíticas para DES sobre superfície de carbono vítreo em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ . A varredura foi feita na faixa de potencial de 0,2 a 0,8 V. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$87	87
Tabela 6 - Estudos de repetibilidade das análises de DES $5,66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vitreo em eletrólito de suporte (Tampão BR 0,04 mol L ⁻¹). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$88	88
Tabela 7 - Estudos de reprodutibilidade das análises de DES $5,66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em eletrólito de suporte (Tampão BR 0,04 mol L ⁻¹). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$89	89
Tabela 8 - Resultados obtidos para curvas de recuperação do DES sobre superfície de carbono vitreo em eletrólito de suporte, formulação comercial e águas de rio. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$95	95
Tabela 9 - Resultados obtidos a partir das curvas de UV-Vis para o DES em tampão BR.....97	97
Tabela 10 - Resultados obtidos para curvas de recuperação do DES utilizando a técnica de UV-Vis.....98	98
Tabela 11: Valores das cargas de Mulliken calculadas para os átomos numerados na estrutura.....113	113
Tabela 12 - Resultados obtidos a partir das curvas analíticas para MDP sobre superfície de carbono vítreo em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2. A varredura foi feita na faixa de potencial de 0,4 a 0,6 V. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$123	123

Tabela 13 - Estudos de repetibilidade das análises de MDP $9,90 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ sobre carbono vítreo em eletrólito de suporte (Tampao BR 0,04 mol L ⁻¹). $f = 20$ s ⁻¹ , $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV.....	124
Tabela 14 - Estudos de reprodutibilidade das análises de MDP $5,66 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ sobre carbono vítreo em eletrólito de suporte (Tampao BR 0,04 mol L ⁻¹). $f = 20$ s ⁻¹ , $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV.....	124
Tabela 15 - Resultados obtidos para curvas de recuperação do MDP sobre superfície de carbono vítreo em eletrólito de suporte, formulação comercial e águas de rio. $f = 20$ s ⁻¹ , $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV.....	130
Tabela 16 - A) Espectros de UV-Vis para o padrão de MDP em meio aquoso no intervalo de concentração de: $7,40 \times 10^{-7}$ a $1,85 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . B) Curva de calibração para a MDP obtida a partir dos experimentos de UV-Vis. $\lambda_{max.} = 280$ nm.....	132

Lista de Abreviaturas

$\Delta E_{1/2}$	Potencial de meia onda
ΔE_p	Diferença de Potencial de pico anódico e catódico
ΔE_s	Incremento de Potencial Aplicado
a	amplitude de potencial
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C ₁₈	Octadecilsilano
CAP	Cloranfenicol (do inglês <i>Chloranphenicol</i> , CAP)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLEN	Clenbuterol
CPB	Brometo de Cetil Piridina (do inglês <i>Cetylpyridinium bromide</i> , CPB)
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio (do inglês <i>cetyltrimethylammonium bromide</i> CTAB)
DES	Dietilestilbestrol
DFT	Teorema do Funcional Densidade (do inglês <i>Density Functional Theory</i> , DFT)
ECS	Eletrodo de Calomelano Saturado
E _{pico}	Potencial de pico
ETE's	Estação de tratamento de efluentes
F	Constante de Faraday
f	frequência de aplicação de potencial
FIA	Análise de Injeção em Fluxo (do inglês <i>Flow Injection Analysis</i> , FIA)
GGA	Aproximação de Gradiente Generalizado (do inglês <i>generalized gradient approximation</i> , GGA)
HOMO	Orbital molecular mais alto ocupado (do inglês <i>highest occupied molecular orbital</i> , HOMO)
I _p	Corrente de pico

LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LUMO	Orbital molecular mais baixo desocupado (do inglês <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> , LUMO)
m	número de prótons
MDP	Metildopa
n	número de elétrons
P.A.	Pureza Analítica
PCB	policloradas (do inglês <i>PolyChlorinated Biphenyls</i> , PCB)
POPs	poluentes orgânicos persistentes
R	Coeficiente de correlação
R	Coeficiente de Correlação
RSD	Desvio Padrão Relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i> , RSD)
S	Coeficiente Angular
S _e	Desvio Padrão do Intercepto
T	Temperatura
Tampão BR	Britton-Robinson
Triton X-100	4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol) fenil Triton X-100
UPLC	Ultra Cromatografia Líquida (do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> , UPLC)
UPLC-MS/MS	Ultra cromatografia Líquida acoplada a dois detectores massa(UPLC-MS/MS)
UV-vis	Espectroscopia no Ultravioleta e Vísivel
v	velocidade de varredura de potencial
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	Fármacos	23
1.1.1	<i>Dietilestilbestrol</i>	24
1.1.2	<i>Metildopa.....</i>	33
2	OBJETIVO.....	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	Reagentes e soluções.....	40
3.1.1	<i>Reagentes</i>	40
3.1.2	<i>Soluções.....</i>	41
3.1.3	<i>Preparo das Soluções tampão</i>	41
3.1.4	<i>Soluções Estoque dos padrões.....</i>	41
3.1.5	<i>Solução da formulação farmacêutica do DES e MDP</i>	42
3.2	Eletrodos e célula eletroquímica.....	43
3.3	Instrumentação.....	44
3.4	Procedimento experimental.....	44
3.4.1	<i>Limpeza do eletrodo de trabalho</i>	44
3.4.2	<i>Metodologia do trabalho.....</i>	45
3.4.3	<i>Estudo do eletrólito suporte.....</i>	45
3.4.4	<i>Estudo eletroquímico do DES e MDP.....</i>	45
3.4.5	<i>Estudos químico-computacionais.....</i>	46
3.4.6	<i>Metodologia eletroanalítica para determinação de DES e MDP.....</i>	48

3.4.6.1	Construção das curvas analíticas.....	48
3.4.6.2	Aplicação da metodologia em diferentes matrizes	48
3.4.8	<i>Tratamento estatístico dos resultados.....</i>	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Dietilestilbestrol.....	52
4.1.1.	<i>Caracterização Eletroquímica</i>	52
4.1.1.1	Estudo do Eletrólito de Suporte.....	52
4.1.1.2	Estudo do pH do meio.....	54
4.1.2.	<i>Caracterização Voltamétrica</i>	59
4.1.2.1	Número de ciclos e potencial de inversão.....	59
4.1.2.2	Estudo da velocidade de varredura e avaliação dos critérios de diagnóstico voltamétricos	63
4.1.3.	<i>Estudo computacional do mecanismo redox do DES.....</i>	66
4.1.4.	<i>Estudos de voltametria de onda quadrada</i>	75
4.1.4.1	Frequência de aplicação de pulso de potencial.....	76
4.1.4.2	Amplitude de pulso.....	78
4.1.4.3	Incremento de varredura	79
4.1.4.4	Estudo das componentes de corrente.....	81
4.1.5	<i>Determinação Eletroanalítica</i>	83
4.1.5.1	Construção das Curvas Analíticas	83
4.1.5.2	Avaliação da precisão da metodologia	88
4.1.5.3	Avaliação da exatidão da metodologia	89
4.1.5.4	Comparação com a técnica de UV-vis	96
4.2	Metildopa.....	99

4.2.1.	<i>Caracterização eletroquímica</i>	99
4.2.1.1.	Estudo de pH.....	99
4.2.2.	<i>Caracterização voltamétrica</i>	102
4.2.2.1	Estudo do potencial de inversão e estabilidade voltamétrica	102
4.2.2.2	Estudo da velocidade de varredura e avaliação de critérios de diagnóstico 106	
4.2.3	<i>Estudo computacional do mecanismo redox da metildopa</i>	109
4.2.4.	<i>Estudo de voltametria de onda quadrada</i>	115
4.2.3.1	Frequência de aplicação de pulso de potencial.....	115
4.2.3.2	Amplitude de pulso	116
4.2.3.3	Incremento de varredura	118
4.2.3.4	Estudo das componentes de corrente	119
4.2.5.	<i>Determinação Eletroanalítica</i>	120
4.2.5.1	Construção das curvas analíticas.....	120
4.2.5.2	Avaliação da precisão da metodologia	123
4.2.5.3	Curvas de Recuperação.....	125
4.2.5.4	Comparação com a técnica de UV-vis	131
5	CONCLUSÕES	133
6	REFERÊNCIAS	136

1 INTRODUÇÃO

Dentre os assuntos mais relevantes estudados no que se diz respeito ao meio ambiente, o impacto negativo que o descarte inadequado de substâncias químicas naturais e industrializadas traz à saúde dos seres vivos tem, atualmente, uma considerável atenção.

Fármacos, metais pesados, hormônios, antibióticos, pesticidas, cosméticos, bifenilas policloradas (do inglês *PolyChlorinated Biphenyls*, PCB), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), surfactantes alquilfenóis e seus derivados etoxilados são destacados por diversos autores como contaminantes emergentes^{1,2}. Estes são poluentes que estão presentes no meio ambiente em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} e devem ser monitorados por conterem resíduos danosos à saúde humana, animal e ao meio ambiente.^{3,4}

O acúmulo de tantos compostos nocivos no ambiente se deve tanto a crescente utilização e descarte inadequado dessas substâncias quanto à estabilidade físico-química que estas apresentam, mesmo em longo prazo.

A atuação negativa destas substâncias pode ocorrer de formas diferentes em cada lugar, dependendo de sua concentração e das propriedades físicas e químicas, como: solubilidade em água, pH, coeficiente de partição, hidrofobicidade, coeficiente de adsorção, mecanismos de biotransformação e estabilidade química e térmica.

Um dos principais recursos naturais prejudicados pelos contaminantes emergentes são os recursos hídricos, visto que a principal via de descarte para os resíduos são os lagos e rios, irregularmente utilizados para tanto. Esta prática irregular gera um problema de saúde pública, já que muitos destes são utilizados como fonte de água para consumo humano e/ou abastecimento público, levando os contaminantes para dentro das casas da população. Além disso, boa parte desta água é utilizada para irrigação em áreas de plantio, contaminando o solo e o lençol freático, e nas etapas de beneficiamento de alimentos, configurando outra fonte de contaminação bem frequente.⁵

Compostos orgânicos, sintéticos e naturais, compreendem uma grande porcentagem dos contaminantes emergentes e persistentes, contrariando o que seria naturalmente esperado, que é a degradação natural com o passar do tempo e em condições ambientais adequadas. Sendo assim, surge uma classe de compostos orgânicos conhecidos como poluentes orgânicos persistentes (POPs), que são substâncias muito investigadas devido aos seus efeitos no meio ambiente, mesmo em concentrações relativamente baixas.⁵ Dentre os POPs, os hormônios e fármacos têm tido uma particular atenção da comunidade científica por serem utilizados em larga escala em tratamentos terapêuticos por seres humanos e terem a capacidade de acumular-se em seres vivos que tenham ingerido tais substâncias, ampliando seus efeitos maléficos à saúde.⁶

1.1 Fármacos

É difícil mensurar a quantidade de fármacos produzidos e utilizados em todo o mundo. Os fármacos são desenvolvidos para serem relativamente persistentes e atuarem no organismo de seres vivos de forma específica. Entretanto, a capacidade de resistir a certas “agressões químicas” proporciona aos fármacos uma capacidade maior de poluírem o ambiente.

Segundo a literatura, uma parte significativa da dose terapêutica ingerida, cerca de 50% a 90%, é excretada de forma inalterada ao meio ambiente⁷. Além disso, pode ser excretado ainda, o composto já metabolizado, onde em muitos casos, este metabólito é tão ou mais agressivo quanto o composto de partida.

Pesquisas em diversos países foram feitas, e mostraram a presença de fármacos e seus metabólitos em águas naturais e esgotos domésticos. Dentre os fármacos mais perigosos estão os estrogênios, tanto naturais como sintéticos. Estes compostos foram detectados em ETE's de países como: Brasil, Alemanha e Canadá; e são oriundos de um processo de tratamento incompleto e incapaz de remover completamente os traços de estrogênios.^{8,9}

A ocorrência de fármacos no meio ambiente pode ocasionar diversos tipos de problemas, nos mais diversos níveis tróficos apresentados, tanto em ambientes aquáticos como terrestres. Os efeitos nocivos podem afetar tanto em nível celular, prejudicando órgãos e sistemas inteiros, como o sistema endócrino humano, que compreende diversos órgãos reguladores da excreção de hormônios essenciais para o funcionamento e desenvolvimento humano adequado.²

Os fármacos desreguladores endócrinos são *“uma classe de composto exógeno que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino e têm, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações”*¹⁰. Dentre estes, os hormônios apresentam uma particular importância visto a sua larga aplicação fitoterápica desde longa data. Um dos mais importantes hormônios interferentes endócrinos conhecidos é o dietilestilbestrol (DES).^{5,11}

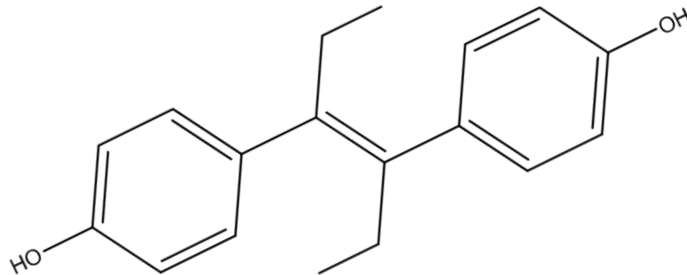
Outro grupo de diferente raio de ação, mas não menos importantes, são os compostos com atividade anti-hipertensiva. Dentre estas se destacam as catecolaminas, moléculas que atuam no sistema nervoso central e podem ser usadas no tratamento e prevenção de infarto do miocárdio, hipertensão e asma bronquial⁷. Dentro desta classe de fármacos está a metildopa (MDP), amplamente utilizada e por atuar no sistema nervoso central, pode ser um poluente de alto risco à saúde pública.

Assim, tendo em vista os problemas decorrentes do acúmulo do DES e MDP, estes fármacos foram objetos de estudo deste trabalho. Nos sub-tópicos a seguir será apresentada uma revisão bibliográfica sobre estes compostos.

1.1.1 Dietilestilbestrol

O Dietilestilbestrol (DES),^{12,13} 4,4'-(1,2-dietil-1,2,eteno-diil)bisfenol, Figura 1, é um estilbeno e é o anabolizante mais potente por possuir uma atividade estrogênica dez vezes maior que a do estrógeno natural 17- β estradiol.

Figura 1 - Representação estrutural do dietilestilbestrol.



Fonte: O próprio autor.

O DES foi uma das primeiras substâncias a ter atividade desreguladora endócrina comprovada, porém, até hoje ainda tem um uso bastante difundido em diversas áreas. Ele tem um importante uso medicinal, sendo comumente utilizado no tratamento da síndrome da menopausa e como método contraceptivo feminino³. A exposição ao DES apresenta graves consequências a saúde da mulher, principalmente para as filhas de mulheres que fizeram uso desta substância, apresentando problemas como: câncer, infertilidade, deformações uterinas, dentre outros problemas que na sua maioria são descobertos apenas na idade adulta.¹²⁻¹⁴.

Além do uso terapêutico, o DES também é bastante utilizado como anabolizante na pecuária em diversos países, devido às vantagens econômicas que traz à pecuária de corte. Alguns dos principais países produtores de carne bovina fazem uso de anabolizantes a fim de aumentar a produção de carne^{15,16}. Diversos outros anabolizantes vêm sendo alvo de estudos devido ao potencial carcinogênico, além de outros problemas como: o desenvolvimento sexual precoce em crianças, avanços na idade óssea com repercussões negativas no crescimento¹⁴.

Modo de ação

Apesar de ainda não estar muito bem esclarecido, a comunidade científica reconhece três possíveis modos de ação dos interferentes endócrinos:¹⁷

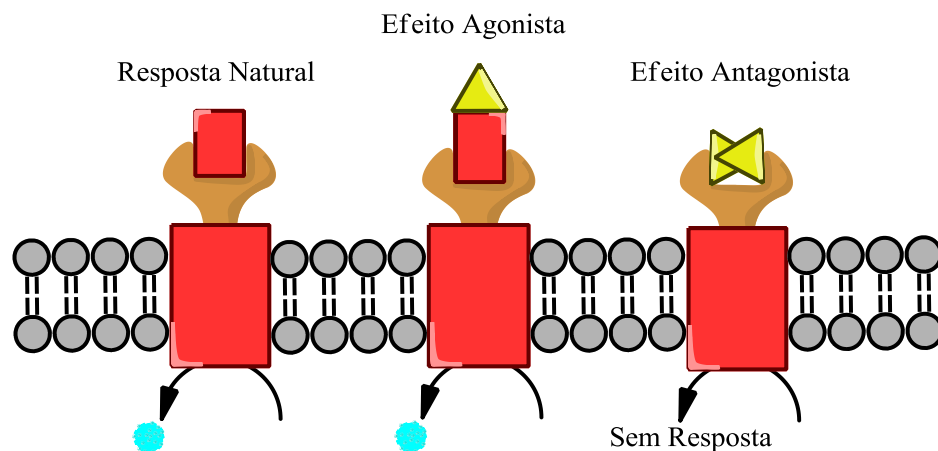
- a) Imitando um hormônio produzido naturalmente pelo corpo, como o estrogênio ou a testosterona, e reproduzindo seu efeito no organismo do ser vivo.
- b) Bloqueando os sítios receptores dos hormônios nas células, impedindo que o hormônio natural possa estimular a célula.
- c) Afetando o metabolismo, transporte, síntese e excreção dos hormônios, refletindo em sua concentração dentro do sistema endócrino.

De acordo com estes possíveis modos de ação, os interferentes endócrinos podem ser classificados como:

- a) Agonistas: imitam os efeitos dos hormônios naturais, ocupando os receptores hormonais;
- b) Antagonistas: bloqueiam os receptores hormonais naturais.

A Figura 2 Apresenta um esquema explicativo para uma interferência endócrina agonista e antagonista.

Figura 2 - Esquema ilustrativo da atuação de uma molécula de desregulação endócrina, com os efeitos agonista e antagonistas.



Fonte: O próprio autor.

É difícil afirmar com precisão o tipo de efeito que uma determinada molécula terá, já que a mesma molécula pode atuar tanto de forma agonista como antagonista, dependendo do organismo a que venha interferir.

Os problemas causados à população pelo uso e ingestão de compostos com capacidade de causar distúrbios endócrinos ainda se agrava quando se leva em consideração o descarte inadequado desses compostos ou a eliminação natural dos seres vivos, levando a contaminação para os rios, lagos e todos os tipos de mananciais. Sendo assim, é importante que se tenha capacidade de avaliar o nível de exposição a esses compostos.

Usualmente são utilizadas técnicas espectroscópicas para a determinação do DES, porém, altos limites de detecção e interferência da composição da matriz fazem com que se busque metodologias alternativas para a determinação do DES em amostras biológicas. Técnicas cromatográficas também podem ser utilizadas, porém, estas demandam etapas complexas de pré-tratamento e extração de amostra, além de alto custo e, em muitos casos, geram grandes quantidades de resíduos de análise, o que torna a metodologia inviável para uso em rotina laboratorial.

Estudos e metodologias empregadas

Métodos de fluorescência^{13,18}, cromatográficos¹⁹⁻²³, espectrofotométricos^{24,25}, dentre outros, são comumente utilizados para determinação de compostos orgânicos, e apesar de serem bastante utilizados apresentam a desvantagem de serem complexos e necessitarem de um tempo de análise relativamente longo, e a aplicação de etapas de tratamento e pré-concentração tornam a metodologia cara.

Para a determinação do DES, a farmacopéia Britânica e Americana recomendam metodologias que utilizam Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrofotometria^{26,27}. Entretanto, na busca de metodologias de detecção e quantificação cada vez mais eficazes, a pesquisa e desenvolvimento destes métodos é bastante reportada.

Chen *et al.*²² utilizaram a ultra cromatografia líquida (do ingles Ultra Performance Liquid Chromatography) com dois detectores de massa acoplados (UPLC-MS/MS) para determinar simultaneamente clenbuterol (CLEN), cloranfenicol (PAC) e dietilestilbestrol (DES) no leite bovino. Na determinação foi utilizado o método

do padrão interno na concentração de 25, 100 e 100 ng mL⁻¹ de CLEN-D9, CAP-D5 e DES-D8, respectivamente, em 10 g leite. Os analitos foram diluídos em 15 mL de acetato de etila e 500 µL de acetato de amônio 5 mM. A solução resultante foi filtrada através de um filtro com diâmetro de poro de 0,22 µm e 10 µL do filtrado foi injetado no UPLC em coluna de octadecilsilano (C₁₈). As curvas de calibração foram obtidas nas faixas de concentração de droga em 0,2-20 ng mL⁻¹ (CLEN), 1,2-100 ng mL⁻¹ (PAC) e 2,0-200 ng mL⁻¹ (DES) e o coeficiente de correlação foi de 0,9992. Para a determinação dos compostos nas amostras de leite bovino foi necessária uma etapa de purificação em uma coluna SPE. Os valores de recuperação nas amostras de leite variaram de 94,5 a 106% e os valores de repetibilidade e reprodutibilidade foram de 4,7 a 5,3%, e de 5,0 a 5,6%, respectivamente. A metodologia foi validada de acordo com a *European Union regulation 2002/657/EC*.

Yang *et al.*²³ propuseram um método para determinação de DES em produtos lácteos, que empregava uma combinação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com as propriedades dos nano tubos de carbono de parede múltipla. Os nanotubos foram incorporados em fibras ocas e estas, por sua vez, foram agregadas as colunas de extração em fase sólida da coluna de separação do CLAE. Para avaliar a eficácia das colunas modificadas foram analisados parâmetros físicos e químicos, como: tamanho das fibras, temperatura, pH, tempo de extração e dessorção e solvente empregado na fase móvel. O procedimento desenvolvido foi aplicado na avaliação de sete produtos derivados do leite. Para tanto, foi feita uma curva de calibração na faixa de 24 a 960 µg L⁻¹. Os resultados mostraram um coeficiente de correlação de 0,993 e uma boa repetibilidade, com desvio padrão de 7,51% para uma contaminação de 240 µg L⁻¹. Por fim, as amostras de derivados de leite foram analisadas nos níveis de fortificação de 50% e 100% e apresentaram valores de recuperação de 57,5% e 120,42%, com um desvio padrão de 7,36% e 12,04%, respectivamente.

Como mostra a literatura, os métodos cromatográficos demandam uma complexa preparação de amostra e ajustes de parâmetros que tornam o método difícil de ser aplicado em uma rotina de análise, principalmente, análise de campo.

Como uma alternativa aos métodos cromatográficos, alguns autores vêm desenvolvendo métodos que se baseiam na luminescência de substâncias estimuladas por reações químicas específicas, que podem ser relacionadas com um analito em questão. Este fenômeno pode ser acoplado a outras técnicas de separação e fornecer uma melhora nos limites de detecção, além de possuírem boa seletividade.

Wang *et al.*¹⁴ utilizaram a quimioluminescência de injeção de fluxo para a determinação de DES. O método proposto utilizou a capacidade do próprio analito, DES, de aumentar a reação de quimioluminescência de luminol-H₂O₂, catalisada por cobalto ftalocianina tetrassulfonada em meio alcalino para gerar um sinal analítico que possa ser relacionado a concentração do DES. Os resultados mostraram uma faixa de linearidade de $1,0 \times 10^{-7}$ a $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $6,42 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, N = 3. O método foi aplicado para a determinação de dietilestilbestrol nas formulações farmacêuticas, além de Dienestrol e hexestrol, alquilfenóis especificamente semelhantes ao dietilestilbestrol. A precisão das recuperações foi de 92% e o desvio padrão de 2,6% para um N = 11. Apesar dos resultados apresentados, os autores relataram problemas de interferência de matriz das amostras utilizadas, sendo necessária etapas de pré-tratamento como extração por solvente e pré-concentração das amostras para possibilitar a quantificação dos fármacos.

Secundo *et al.*¹⁸ apresentaram uma metodologia para determinação de DES em amostras de leite utilizando a luminescência de um complexo de Tb³⁺ conjugado com um anticorpo extraído de cabra e utilizado como marcador. Os complexos de lantanídeos são altamente luminescentes e permitem alcançar limites de detecção de 0,5 mg L⁻¹. Para avaliar a metodologia, os parâmetros de limite de detecção, sensibilidade e precisão foram utilizados. O limite de detecção foi de 10 pg g⁻¹ e os valores de sensibilidade e precisão estiveram de acordo com a literatura adequada. A aplicação do método foi feita em duas amostras de leite e os valores recuperados foram de 96% e 104,2%.

Os métodos eletroquímicos, por sua vez, fornecem alternativas viáveis para a determinação de compostos com atividade desreguladora endócrina. Suas principais vantagens estão em apresentar baixos limites de detecção e quantificação, além de

serem mais rápidos e dispensarem etapas complexas de pré-tratamento e preparo de amostra.

Na determinação de DES utilizando técnicas eletroquímicas algumas propostas estão relatadas na literatura.

Zhang *et al.*²⁸ determinaram DES em amostras do hormônio injetável. O método proposto utilizou eletrodo de pasta de carbono como superfície eletródica e como eletrólito foi utilizado o tampão fosfato. No preparo da pasta de carbono os autores utilizaram 1 μL de óleo de parafina para fixação e 25 mg de grafite que foram misturados em um pequeno almofariz. As medidas foram feitas em tampão fosfato pH 7 e o potencial de oxidação do DES obtido foi 0,51 V vs ECS (Eletrodo de Calomelano Saturado). Estudos de pré-concentração mostraram um forte efeito adsorptivo do produto de oxidação do DES, já que o sinal redox diminuiu com o tempo de acumulação. A fim de reduzir o efeito adsorptivo foram utilizados surfactantes CTAB, CPB e Triton X-100 junto à solução contendo o DES. O uso dos surfactantes mostrou uma melhoria no sinal de corrente do DES, sendo o CPB o que mais se destacou. Na determinação de DES foi utilizada voltametria de varredura linear e o limite de detecção obtido foi de 1×10^{-8} mol L^{-1} com um desvio padrão de 3,1% para uma concentração de DES de 5×10^{-5} mol L^{-1} . A porcentagem de recuperação para as amostras de DES injetável foi de 101,9% e o desvio padrão foi de 1,93% para $n = 5$.

Bin *et al.*²⁹ desenvolveram estudos farmacocinéticos com o DES em amostra de sangue de coelho. Para tanto, os autores estudaram os parâmetros eletroquímicos do DES sobre superfície de carbono vítreo utilizando as técnicas de voltametria linear e pulso diferencial. Os estudos preliminares com o DES foram feitos em meio de tampão BR e os autores puderam observar que a relação entre o número de prótons e elétrons para a oxidação do DES foi de 1:1. Além disso, um estudo de velocidade de varredura mostrou que em meio ácido existe uma relação linear entre a corrente de pico I_p e a raiz quadrada da velocidade $v^{1/2}$, sendo esta uma característica de processos controlados por difusão. Os resultados em meio neutro também mostraram uma relação linear de I_p vs $v^{1/2}$, mas apenas na faixa de velocidades de 5 a 200 mV s^{-1} , valores de velocidade acima de 200 mV s^{-1} mostrou uma perda de linearidade. A voltametria de pulso

diferencial foi a técnica escolhida para o desenvolvimento do método analítico. Para o desenvolvimento da metodologia os autores utilizaram o pH 12, previamente estudado, sendo este o que apresentou melhor sinal analítico. Os parâmetros voltamétricos selecionados para as análises foram 140 mV de amplitude e largura de pulso de 100 mV. A faixa de linearidade obtida foi de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com um coeficiente de linearidade de 0,993. O limite de detecção alcançado foi de $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e o desvio padrão para uma concentração de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi de 2,0%. A aplicação da metodologia em soro, de acordo com o que foi descrita pelo autor, mostrou um valor de 97,25% com um desvio padrão de 1,44%.

Biryol *et al.*¹¹ estudaram o comportamento eletroquímico do DES utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (do inglês *Differential Potential Voltammetry*, DPV), e a superfície eletródica utilizada foi o carbono vítreo. As soluções estoque de DES $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em meio de metanol/água 45/55 (v/v) e acetonitrila/água 9/1 (v/v). Os testes preliminares foram feitos usando como eletrólito suporte uma solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão BR $0,04 \text{ M}$. Os resultados obtidos por voltametria cíclica mostraram, em baixas velocidades, dois picos de oxidação para o DES em meio de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, o primeiro em $0,85 \text{ V}$ e o segundo em $1,0 \text{ V}$. Com o aumento da velocidade de varredura ambos os potenciais de pico deslocaram-se para valores mais positivos. Acima de 1500 mV s^{-1} apenas um dos picos foi visualizado. Em tampão BR foram estudados o efeito do pH e velocidade de varredura. O potencial de pico de oxidação do DES se deslocou para valores mais negativos com o aumento do pH. Também foi observada uma dependência entre a velocidade de varredura e a reversibilidade do processo redox. Em velocidades de varredura até 200 mV s^{-1} foram observados os picos de oxidação e redução, e em valores de velocidade acima deste, apenas picos de oxidação foram visualizados. Uma metodologia de determinação para o DES foi desenvolvida utilizando a técnica de DPV. Os resultados mostraram uma faixa de linearidade maior quando o estoque foi preparado em metanol/água. A repetibilidade do método foi avaliada para um total de 10 medidas e o valor obtido para o desvio padrão foi de 1,07%. Os limites de detecção e quantificação foram de $8,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$,

respectivamente. A aplicação do método foi feita em amostras de sangue em diferentes níveis de fortificação e percentuais de recuperação que variaram de 87% a 93,16%, tendo uma média de 91,44% com um desvio padrão de 4,47%.

Liu *et al.*³⁰ desenvolveram um sensor eletroquímico para a detecção de DES. O sensor tratava-se de um nanocompósito formado de sílica-nanopartículas de ouro-nanotubos de carbono de multi parede (MSN-PNB-MWCNTs). O nanocompósito servia de suporte, e possibilitava estabilidade e melhora da eletroatividade do composto bioconjugado de enzima peroxidase-anticorpo-azul da Prússia-nanotubos de carbono multiparede (HRP-Ab-PNB-PB-MWCNTs) que seria seletivo ao DES. Após a otimização das condições experimentais foram obtidas curvas de calibração, e uma faixa linear de $3,3 \times 10^{-7}$ mg/mL a $4,5 \times 10^{-3}$ mg/mL foi alcançada, onde o coeficiente de correlação obtido foi 0,996. O limite de detecção foi de $1,2 \times 10^{-7}$ mg/mL. A aplicação do sensor foi feita em amostras de leite com 3 níveis de contaminação 1×10^{-5} , 1×10^{-4} e 1×10^{-3} mg/mL e os valores de recuperação foram de 98%, 105% e 96%, respectivamente. Segundo o autor, o sensor apresentou ótima seletividade, reprodutibilidade e longo prazo de estabilidade, já que após 7 dias estocado em uma solução tampão pH 7,2 o sensor apresentou uma resposta 93,5% da inicial.

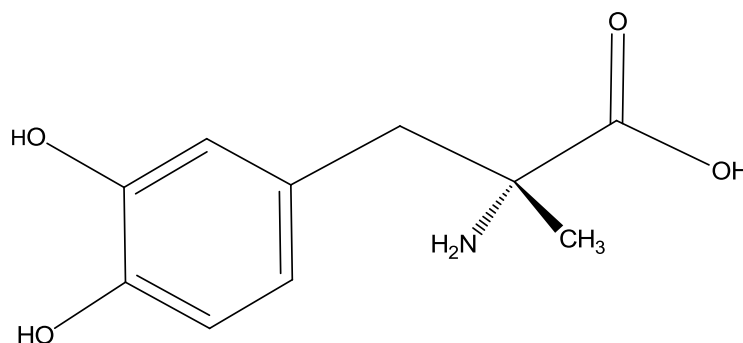
D. Lu *et al.*³¹ prepararam um eletrodo modificado pelo compósito de nanofolhas de óxido de grafeno funcionalizadas por ciclodextrina (β -CD-RDO). O compósito foi obtido via redução utilizando o ácido ascórbico como agente redutor e foi utilizado como agente modificador de uma superfície de carbono vítreo para a detecção de DES. Após o preparo da superfície, parâmetros experimentais foram avaliados por voltametria cíclica, como: meio tamponante, pH e tempo de acumulação. Os resultados mostraram que em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) o sensor apresentou uma melhor sensibilidade na detecção do DES. O tempo de acumulação foi otimizado em 200 s, tempo em que o maior sinal de DES foi obtido. Em tempos maiores foi notada uma redução do sinal eletroquímico, mostrando uma saturação do eletrodo. Para avaliar o desempenho analítico do sensor foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV). Uma relação linear de 0,01 a $13 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ foi adquirida com um coeficiente de correlação de 0,9986. O limite de detecção foi de 4 nmol L^{-1} para um

N=3. A aplicação do sensor foi feita em diferentes amostras de leite e os valores de recuperação para o DES variaram de 95,5% a 106%.

1.1.2 Metildopa

A metildopa (L- α -Metil-3,4-dihidroxifenilalanina), Figura 3, é um composto do grupo das catecolaminas caracterizado pelo grupo catecol, dihidroxila ligadas ao anel aromático. O grupo catecol apresenta um baixo potencial de oxidação, sendo facilmente oxidado a orto-quinona. Este baixo potencial de oxidação confere a molécula alta atividade antioxidante, como é o caso dos flavonóides, compostos naturais encontrados em frutas, vegetais e chás verdes, conhecidos pela capacidade de eliminar os radicais livres reduzindo o envelhecimento precoce^{32,33}.

Figura 3 - Representação estrutural da metildopa (MDP).



Fonte: O próprio autor.

Alguns derivados de catecol participam do metabolismo humano, como é o caso das catecolaminas, caracterizadas por um grupo amino ligado ao anel aromático que contém o grupo catecol. As principais e mais abundantes catecolaminas são a adrenalina, noradrenalina e dopamina. Estas são produzidas, naturalmente, pelo corpo e libertadas pela glândula suprarrenal em situações de estresse, como estresse psicológico ou hipoglicemia, desempenhando um papel fundamental na mobilização de

substratos energéticos para o Sistema Nervoso Central (SNC) e tecido muscular durante a reação de estresse⁷.

Por sua vez, a metildopa é um fármaco comumente utilizado no tratamento de hipertensão moderada a severa. Seu modo de ação está relacionado à conversão de sua estrutura para a α -2-metil-norepinefrina nos terminais dos nervos adrenérgicos do sistema nervoso central. Esse composto formado estimula os centros α -adreno-receptores levando a diminuição de catecolaminas periféricas, como adrenalina e noradrenalina⁷. Devido a seu modo de atuação é chamada de composto α agonista.

Apesar de ser extremamente utilizado em tratamento médico, seu uso está relacionado a uma série de efeitos colaterais como:

- a) Cardiovasculares: bradicardia, resposta pressora paradoxal, hipotensão, pericardite.
- b) SNC: sedação, vertigem, cefaléia, parestesias, insuficiência cerebro-vascular, Paralisia de Bell, coreoatetose.
- c) TGI: náuseas, vômitos.
- d) Hepáticos: icterícia, hepatite, alteração de testes de função hepática.
- e) Endócrinos: ginecomastia, lactação, amenorréia.
- f) Hematológicos: trombocitopenia, anemia hemolítica, teste de Coombs positivo.

O monitoramento deste fármaco em formulações farmacêuticas é feito utilizando-se a técnica de Uv-Vis, de acordo como a metodologia descrita na farmacopeia brasileira.³⁴ Entretanto, na determinação deste em amostras de água e outras matrizes a espectrofotometria pode não apresentar bons resultados, devido aos altos limites de detecção alcançados, sendo inadequada para este fim.

Estudos de metodologias aplicando diferentes técnicas na determinação da metildopa são relatados na literatura, inclusive novos métodos para determinação por Uv-Vis. Vieira *et al.*²⁴ desenvolveram um método para determinação de metildopa e dopamina em formulações farmacêuticas utilizando a enzima polifenol oxidase extraída da raiz da batata doce. A enzima foi utilizada a partir do extrato bruto da raiz da batata doce, sem ser feita uma separação. O método se baseia na oxidação enzimática da

metildopa e dopamina às quinonas, metildopaquinona e dopaminaquinona, estas por sua vez, sofrem uma alta oxidação espontânea formando a *methyldopachrome* e a *dopaminechrome*, que apresentam uma forte absorção em 480 e 470 nm, respectivamente. A metodologia foi empregada na determinação do fármaco em tabletes. As soluções foram preparadas dissolvendo-se os tabletes em tampão fosfato e parâmetros de repetibilidade e recuperação foram avaliados. A repetibilidade apresentou valores de desvio padrão de 1,27% e 1,68% para as amostras contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de metildopa e dopamina ($n = 10$), respectivamente. As curvas de calibração foram construídas em meio de tampão fosfato pH 7, obtendo uma linearidade de $2,0 \times 10^{-4}$ a $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os limites de detecção calculados foram de $3,4 \times 10^{-5}$ para a metildopa e $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a dopamina e os valores das recuperações apresentaram-se na faixa de 97,5% e 102,9% para ambos os compostos.

Ribeiro *et al.*³⁵ propuseram um método de determinação da metildopa empregando a complexação deste com os íons molibdato. A metildopa após reagir com íons molibdato forma um produto amarelo que apresenta um máximo de absorção em 210 nm. Na metodologia empregada foi utilizada a análise de injeção em fluxo (FIA) acoplada ao espectrofotômetro. Uma curva de calibração foi preparada apresentando uma faixa de linearidade entre 50 e 200 mg L^{-1} de concentração da metildopa, com um coeficiente de correlação de 0,999. As análises de recuperação foram realizadas em quatro níveis de fortificação e o resultado foi de $99,5\% \pm 0,7$. A repetibilidade da metodologia foi testada em uma solução contendo o equivalente a 150 mg L^{-1} de metildopa e apresentou um desvio padrão relativo menor que 2%.

Gadkariem *et al.*³⁶ desenvolveram um método espectrofotométrico para determinar metildopa em determinações farmacêuticas. A metodologia está fundamentada no acoplamento da metildopa a molécula de 2,6-dicloroquinona-4-clorimida (DCQ), cuja combinação produz uma molécula com um máximo de absorbância em 400 nm. Os tampões fosfato (pH 3, 7 e 9,6) e acetato (pH 8) foram estudados como meio reacional, sendo o tampão acetato em pH 8 o meio que apresentou os melhores resultados. Para a quantificação da metildopa uma curva de calibração foi construída e a lei de Beer foi observada na faixa de 4 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os

limites de detecção e quantificação calculados foram de $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3.21 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Também foram avaliadas a repetibilidade e a reprodutibilidade do método para uma concentração de amostra de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que estes parâmetros apresentaram um desvio padrão menor que 2%. Por fim, a recuperação foi avaliada em amostras de fármacos em tabletes, adequadamente preparadas, e os resultados mostraram recuperações de 99,0% a 101% com um RSD de 0,84 para $n = 3$.

Os métodos cromatográficos também são bastante utilizados na determinação de metildopa, porém, apesar de terem uma melhor performance em termos de limites de quantificação, apresentam a desvantagem de serem mais caros e necessitarem, na maioria dos casos, de etapas de tratamento de amostra.

Desde 1988 a literatura reporta métodos utilizando cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons que são capazes de analisar o teor de L-dopa e metildopa em plasma sanguíneo e líquido cerebrospinal³⁷, porém requerem um preparo pouco trivial da amostra, que exige analistas altamente treinados para desenvolver a metodologia diariamente. Mais recentemente, Róna *et al.*³⁸ determinaram α -metildopa em amostras de plasma humano utilizando cromatografia gasosa com detector de fluorescência. Na metodologia, a sensibilidade da coluna foi melhorada com um estudo da composição da fase móvel, ajustada de acordo com uma programação de gradiente linear. A detecção foi feita utilizando uma radiação de 270 nm para excitação da amostra e 320 nm para a resposta de emissão. Fez-se necessário uma etapa de purificação da amostra, onde foi utilizada uma coluna de extração em fase sólida. O limite de quantificação alcançado foi de 10 ng mL^{-1} de plasma.

Blandini, *et al.*³⁹ propuseram uma modificação dos métodos relatados na literatura para a determinação de L-dopa e metildopa em plasma. Neste método a proposta é determinar, simultaneamente, os compostos na mesma amostra coletada. Para a detecção simultânea foi utilizado um CLAE com um detector amperométrico. Uma série de etapas de pré-tratamento foram requeridas para possibilitar a detecção simultânea. As amostras tiveram que ser incubadas por tempos distintos e quantidades crescentes de L-dopa e metildopa ($0,5, 1, 2, 4, 8, 16 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionadas. Esta prévia dopagem foi usada como padrão para a determinação das concentrações reais

das amostras. O limite de detecção para as amostras de L-dopa e metildopa foram de 1 e 3 ng mL⁻¹ de plasma e os valores de recuperação foram de 94% e 96%, respectivamente.

Oliveira *et al.*⁴⁰ descreveram um método baseado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a dois espectrômetros de massa (CLAE-MS-MS) para a determinação de metildopa em plasma humano utilizando dopa-fenil-D3 como padrão interno. O método foi aplicado em análises de bioequivalência de dois fármacos administrados em 25 pacientes previamente selecionados. O preparo de amostra constou de uma centrifugação dos plasmas, adição de 50 µL do padrão interno (50 µg/mL de dopa-fenil-D3 em meio de metanol/água, 50:50 v/v) e ácido perclórico. Após o preparo da amostra os compostos lipofílicos foram extraídos utilizando para isto 4 mL de diclorometano. O método teve um tempo de corrida cromatográfica de 5,5 min e foi obtida uma curva de calibração com linearidade no intervalo de 20 a 5000 ng mL⁻¹. O limite de quantificação foi de 20 ng mL⁻¹, as precisões intra-dia foram de 7,3%; 5,4% e 4,3%, em 30, 600 e 3000 ng mL⁻¹, respectivamente. As precisões inter-dia foram de 7,7%, 0,5% e 0,7%, respectivamente, nas mesmas concentrações anteriores.

Métodos eletroquímicos também são utilizados para determinação de metildopa. E além de proporcionarem uma maior velocidade de análise, ainda possibilitam o estudo de propriedades intrínsecas da amostra, dando indícios de mecanismo redox do composto.

Shahrokhian *et al.*⁴¹ desenvolveram uma superfície eletrodepositada de Pt-Ru sobre nanotubos de carbono para detecção de metildopa. Para a caracterização eletroquímica da superfície foi utilizada voltametria cíclica e nas determinações analíticas foi utilizada a técnica de pulso diferencial. Na caracterização, estudos de velocidade de varredura mostraram uma relação linear entre o log I_p vs log ν (R = 0,957). Esta relação sugere que o mecanismo redox da metildopa é predominantemente adsorptivo. A partir dos estudos eletroquímicos ainda foi possível determinar o coeficiente de transferência de elétrons e o número de elétrons, sendo 0,5 e 2, respectivamente. Na etapa de determinação analítica foi feita uma curva de calibração onde observou-se duas faixas lineares. A primeira de 0,05 a 4,0 µmol L⁻¹ e a

segunda de 4,0 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato pH 3. Estas diferentes inclinações provavelmente dizem respeito ao acúmulo de metildopa sobre o eletrodo modificado. Em concentrações acima de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ observou-se a saturação da superfície. O limite de detecção alcançado foi de 10 nmol L^{-1} . A aplicação da metodologia foi feita em amostras de fármaco e em plasma. Os valores recuperados foram de 92 a 105% e 96 a 118% para as amostras de fármaco e plasma, respectivamente. O autor ainda reporta que após duas semanas estocado o eletrodo apresentou um sinal analítico referente a 95,3% em relação ao valor inicial.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento e o mecanismo redox do DES e MDP utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada e métodos computacionais e desenvolver uma metodologia simples para a determinação do DES e da MDP sobre superfície de carbono vítreo.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar o comportamento eletroquímico das moléculas de DES e MDP sobre superfície de carbono;
- b) Estudar o mecanismo eletroquímico do DES e MDP e utilizar ferramentas computacionais para auxiliar a análise;
- c) Otimizar os parâmetros eletroquímicos para determinação do DES e MDP sobre superfície de carbono vítreo;
- d) Construir curvas analíticas e avaliar os parâmetros para desenvolvimento da metodologia de determinação dos fármacos;
- e) Determinar, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, quantidades traço do DES e MDP em meio de água natural, formulação farmacêutica e urina sintética.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

3.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho são de pureza analítica (P.A.) e estão apresentados na Tabela 1 com as suas respectivas procedências.

Tabela 1 - Lista de reagentes analíticos utilizados com as respectivas procedências.

Reagente	Fórmula Química	Procedência
Ácido acético	CH ₃ COOH	VETEC [®]
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	VETEC [®]
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	VETEC [®]
Ácido nítrico	HNO ₃	VETEC [®]
Cloreto de potássio	KCl	VETEC [®]
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	VETEC [®]
Hidróxido de sódio	NaOH	VETEC [®]
Fosfato de sódio dibásico anidro	Na ₂ HPO ₄	VETEC [®]
Fosfato de potássio dibásico anidro	K ₂ HPO ₄	VETEC [®]
Fosfato de potássio monodibásico anidro	KH ₂ PO ₄	VETEC [®]
Hidróxido de potássio	KOH	VETEC [®]
Hidróxido de sódio	NaOH	SYNTH [®]
Dietilestilbestrol	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	SIGMA-ALDRICH [®]
Metildopa	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	-----

Fonte: O próprio autor.

O fármaco metildopa foi adquirido por meio de parceria entre o GELCORR e o laboratório de farmacologia da UFC, sob supervisão da professora Dra. Janete Eliza de Sá Soares.

O gás nitrogênio utilizado nos experimentos foi de procedência da White Martins de pureza 4.6 (99,996%).

3.1.2 Soluções

No preparo de todas as soluções foi utilizada água purificada pelo sistema Milli-Q (Milipore inc.) e as vidrarias utilizadas no trabalho foram, sempre que necessário, tratadas com solução sulfonítrica ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$, 1:1) para remoção de impurezas que possivelmente interferissem nas análises.

Por fim, as adições de volume precisos das soluções de trabalho foram feitas com pipetador automático Kacil de volume variável.

3.1.3 Preparo das Soluções tampão

- a) O tampão BR foi preparado pela mistura dos ácidos fosfórico, bórico e acético, todos na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em seguida o pH foi ajustado, com o auxílio de um pHmetro, utilizando uma solução de hidróxido de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. O pH das soluções foi variado de 2 a 12.
- b) O tampão fosfato foi preparado pela mistura de fosfato de potássio dibásico anidro e fosfato de potássio monobásico anidro, ambos na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH foi ajustado com uma solução de hidróxido de potássio 2 mol L^{-1} ou ácido fosfórico P.A. dependendo do pH desejado. Para este tampão o valor de pH foi variado de 4 a 8.
- c) Por último, o tampão borato foi preparado pela mistura das soluções de ácido bórico e tetraborato de sódio na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ destas e o pH ajustado no momento da mistura das soluções para o pH 4 e 7.

3.1.4 Soluções Estoque dos padrões

Uma solução estoque de DES foi preparada pela dissolução de uma massa adequada do composto em uma mistura de etanol/água 1:1. Devido a baixa solubilidade deste composto em água, suficiente para produzir uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para melhor solubilização da amostra foi utilizado um banho ultrassom, onde a

mistura permaneceu por 10 minutos. A partir desta solução foram produzidas, por diluição, utilizando uma micro pipeta, soluções de concentrações $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizada nas etapas de caracterização eletroquímica por voltametria cíclica. Para otimização dos parâmetros da VOQ, soluções de concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas. Estas diluições foram feitas diretamente em meio de tampão Britton-Robinson.

A solução estoque de MDP foi preparada pela dissolução da quantidade adequada do composto em água, produzindo um estoque inicial de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A partir deste, as soluções de concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas e utilizadas nas etapas de caracterização eletroquímica e otimização dos parâmetros analíticos da VOQ, respectivamente.

Para a construção das curvas analíticas e aplicações em amostras reais as soluções foram preparadas sempre buscando as concentrações analíticas mais baixas a fim de atingir os mais baixos valores de limites de detecção e quantificação possíveis.

3.1.5 Solução da formulação farmacêutica do DES e MDP

As soluções foram preparadas a partir dos comprimidos de destilbenol[®]-APSEN e Aldomete[®]. Foram pesados 10 comprimidos do fármaco e calculada a massa média destes. Em seguida, os comprimidos foram triturados em almofariz até a obtenção de uma massa uniforme e, por fim, uma massa adequada para produzir uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do princípio ativo do medicamento (DES) foi dissolvida em uma mistura de etanol /água 1:1. Para garantir a completa separação e dissolução do princípio ativo da amostra, a mistura foi colocada em um banho ultrassom por 20 minutos, centrifugada, e o sobrenadante separado para ser utilizado nas análises.

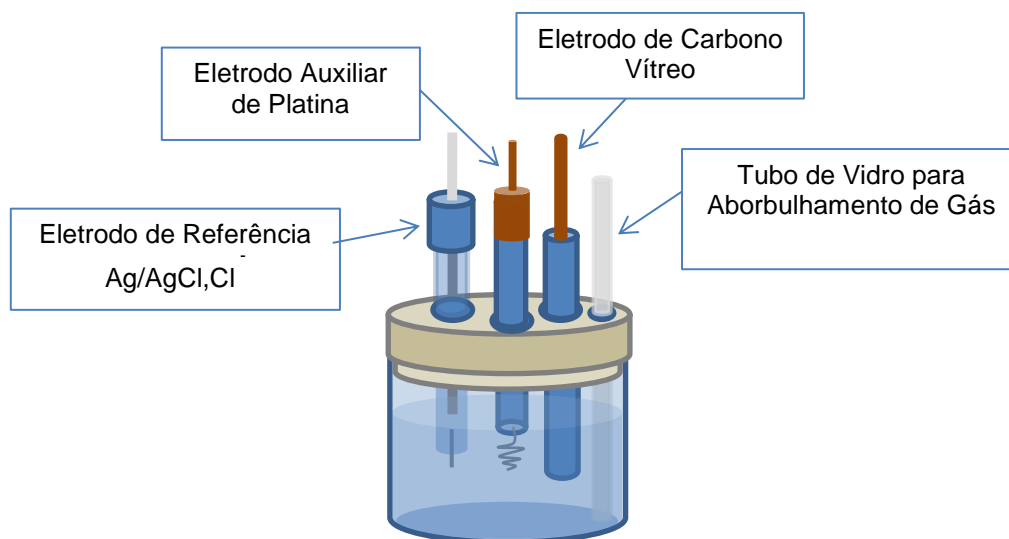
Da mesma forma, uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de MDP foi preparada a partir do medicamento Aldomete[®], também adquirido em drogarias da cidade de Fortaleza. Neste caso, a dissolução foi feita apenas em água, e o uso de ultrassom foi requerido para garantir uma total separação e solubilização do princípio ativo do medicamento.

A partir destes estoques foram preparadas soluções nas concentrações $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para DES e MDP, respectivamente, para serem utilizadas nas etapas de aplicação e recuperação.

3.2 Eletrodos e célula eletroquímica

Para execução das medidas eletroquímicas foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, onde um eletrodo de carbono vítreo foi utilizado como superfície de trabalho, um fio de platina em formato de espiral como eletrodo auxiliar e um fio de prata coberto com uma camada de cloreto de prata eletrodepositada imerso em solução saturada de cloreto de prata foi o eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-_{\text{sat.}}$). Um desenho esquemático da célula eletroquímica está mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Desenho esquemático da célula eletroquímica utilizada no trabalho experimental.



Fonte: O próprio autor.

3.3 Instrumentação

Os estudos eletroquímicos foram feitos em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB, modelo PGSTAT30 (Eco Chemie), acoplado a um microcomputador. O sistema operacional usado para programação das medidas e aquisição de resultados foi o GPES versão 4.9.

As medidas espectrofotométricas na região do UV-Visível foram feitas utilizando um espectrofotômetro de feixe duplo, modelo Cary 1E (Varian), com célula de quartzo de 1cm de caminho óptico.

Todas as pesagens foram feitas em uma balança analítica Kern®, modelo 410, com precisão de $\pm 0,1$ mg e o ajuste de pH das soluções tampões foi feito utilizando-se um pHmetro modelo B474 (Micronal).

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 *Limpeza do eletrodo de trabalho*

O eletrodo de carbono vítreo foi polido em pasta de diamante com granulometria de 3 μm para obtenção de uma superfície limpa e com o mínimo de defeitos possíveis. Desta forma tentou-se minimizar regiões onde a adsorção fosse mais forte, a fim de melhorar a reprodutibilidade das medidas. Este procedimento foi adotado para os experimentos referentes ao DES. Para o estudo da MDP o eletrodo foi tratado em uma lixa de granulometria de 1200 mesh. O procedimento foi feito em forma de oito para garantir uma rugosidade homogênea e, em seguida, o eletrodo era enxaguado com H_2O Milli-Q em abundância.

Em ambos os casos, após o tratamento físico, o eletrodo foi transferido para uma célula eletroquímica contendo solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, onde foram realizados ciclos voltamétricos sucessivos a fim de garantir uma perfeita limpeza, desbloqueando os sítios ativos, e ativação da superfície. Os ciclos foram feitos até se obter um perfil reprodutível e sem indícios de impureza na superfície.

3.4.2 Metodologia do trabalho

No desenvolvimento do trabalho foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. Estas técnicas permitem a avaliação de parâmetros qualitativos e quantitativos de análise, além de fornecerem dados que possibilitam a discussão do mecanismo redox e cinética reacional das moléculas estudadas. Em particular, a técnica de voltametria de onda quadrada ainda permite desenvolver uma metodologia de quantificação analítica de alta sensibilidade.

3.4.3. Estudo do eletrólito suporte

Foi feito um estudo para definir qual o eletrólito suporte mais apropriado a ser utilizado com o fármaco DES. Os eletrólitos avaliados foram: o tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Todos os tampões foram avaliados em pH 4,0 e 7,0, exceto o tampão borato, utilizado apenas em pH 7,0 por não apresentar capacidade tamponante em pH 4,0. Nestes testes a concentração do DES foi $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Este estudo foi feito por VC em uma faixa de varredura de $-0,4 \text{ V}$ a $1,0 \text{ V}$ com uma velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1} e VOQ, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, parâmetros padrões da VOQ.⁴²

Em relação a metildopa, os testes de eletrólito suporte foram descartados tendo em vista a experiência adquirida com os testes para o DES. Desta forma, sabendo que o tampão BR apresenta uma maior janela de pH e uma boa resposta eletroquímica com compostos fenólicos, esse eletrólito foi mantido para os estudos com o fármaco em questão.

3.4.4 Estudo eletroquímico do DES e MDP

Voltametria cíclica

As medidas foram realizadas utilizando uma solução padrão de DES e MDP preparadas de acordo com o tópico 3.1.4, em meio de tampão BR.

Os estudos preliminares foram feitos utilizando VC, a velocidade de varredura de potencial utilizada foi de $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ e a janela de potencial avaliada foi de $-0,4$ a $1,0 \text{ V}$. Múltiplos ciclos e variação da velocidade de varredura foram utilizados para caracterizar os processos redox registrados e obter parâmetros adequados para cada sistema, que permitem avaliar o mecanismo redox dos compostos estudados, aplicando os critérios teóricos adequados. Além disto, a técnica de VC também foi utilizada para avaliar os eletrólitos suporte utilizados no desenvolvimento do trabalho e os resultados obtidos possibilitaram uma avaliação do melhor meio para o desenvolvimento da metodologia analítica.

Voltametria de onda quadrada

Neste trabalho a técnica de VOQ foi utilizada com o intuito de auxiliar tanto no estudo do mecanismo redox quanto para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para determinação de DES e MDP em eletrólito suporte, formulação farmacêutica, urina sintética e águas naturais. Para tanto, inicialmente foi feito um estudo de otimização dos parâmetros da VOQ, onde foram determinados os melhores valores de frequência de onda (f), amplitude de aplicação de pulso (a) e incremento de potencia aplicado (ΔE_s). A análise do comportamento redox das moléculas com a variação dos parâmetros em questão possibilitam a discussão de parâmetros particulares do mecanismo redox de cada molécula estudada.

A partir destes parâmetros estabelecidos foi desenvolvida uma rotina analítica para quantificação do DES e da MDP.

3.4.5 Estudos químico-computacionais

A metodologia de análise computacional foi feita em duas etapas. Inicialmente foram feitos os cálculos das propriedades moleculares e em seguida determinado mecanismo teórico de oxidação das moléculas estudadas.

Inicialmente, foi definida a estrutura em função do pH do meio para se definir qual seria mais adequada para o estudo em cada caso. O *software* Marvin Sketch 5.3.2. foi utilizado nesta etapa.

Os pKa foram estimados a uma temperatura de 298 K, o solvente foi simulado por meio da constante dielétrica da água e foi adotado uma precisão de duas casas decimais em um intervalo de pH entre 0 e 14.

O estudo conformacional foi feito pelo *software* *Forcite*⁴³ e para os cálculos foi usado um campo de força *Universal*. Foram feitos 250 ciclos de *annealing*, cada um com 5 rampas de aquecimento e 100 passos dinâmicos por rampa, totalizando assim 125000 estruturas calculadas. A temperatura foi variada entre 300 e 350 K e as cargas iniciais foram atribuídas pelo campo de força.

No estudo das propriedades moleculares foi utilizado o *software* DMOL³ para o cálculo de relaxamento de geometria, modos vibracionais, energia dos orbitais de fronteira, análise populacional e densidade de estados eletrônicos. O Teorema do Funcional Densidade (do inglês *Density Functional Theory* – DFT) foi usado no cálculo, sendo feita a aproximação de gradiente generalizado (GGA) e os funcionais de gradiente corrigido específico BLYP.

Para determinar a energia de adsorção e orientação das moléculas sobre o substrato foi utilizado o método de Monte Carlo. Para tanto, foram feitos 10 ciclos de aquecimento com 10000 passos de interação cada. A temperatura foi variada entre 295 e 305 K. O campo de força utilizado foi o *COMPASS*.

Após a obtenção dos parâmetros moleculares, foi feita a determinação teórica do mecanismo redox do DES e da MDP com base nas etapas determinadas pelos estudos eletroquímicos. O mecanismo teórico foi obtido com base nas energias dos compostos em cada etapa proposta.

3.4.6 Metodologia eletroanalítica para determinação de DES e MDP

3.4.6.1 Construção das curvas analíticas

Em uma célula eletroquímica foi adicionado 5 mL de eletrólito suporte, em seguida o eletrólito suporte foi desoxigenado por 5 minutos utilizando-se gás nitrogênio de procedência da White Martins, de pureza 4.6 (99,996%). Após a desoxigenação da solução, foram feitos 10 ciclos voltamétricos a fim de estabilizar o sinal da linha de base do branco e então foram feitas adições sucessivas de alíquotas de 100 µL de uma solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ das respectivas soluções estoque de DES e MDP, separadamente, totalizando 10 pontos.

Para cada adição foi feita uma varredura e esse conjunto de curvas forneceu os dados de corrente para o levantamento da curva analítica. É importante ressaltar que após cada varredura foi borbulhado gás nitrogênio durante 1 minuto, para garantir a reprodutibilidade das medidas durante todo o estudo. Após cada curva obtida o eletrodo precisou ser tratado de acordo com o procedimento descrito no sub-tópico 3.4.1.

O procedimento foi repetido e um total de 5 curvas analíticas foram obtidas, em seguida foi feito um tratamento estatístico adequado para obtenção das figuras de mérito.

3.4.6.2 Aplicação da metodologia em diferentes matrizes

As análises de recuperação de DES e MDP, padrão e amostra comercial, foram feitas em eletrólito puro, amostras de água natural e em urina sintética.

A determinação do DES e MDP em eletrólito puro foi feita em meio de tampão BR, onde inicialmente foram adicionados 100 µL da solução estoque de DES ou MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, simulando uma contaminação e, em seguida mais 5 adições das soluções estoque. Para cada adição foi obtido um voltamograma e a partir destes o valor adicionado foi recuperado aplicando-se o tratamento estatístico adequado.

Em amostra comercial de destilbenol[®]-APSEN a determinação foi feita utilizando uma solução do fármaco preparada de acordo com a metodologia descrita no sub-tópico 3.1.5. Uma alíquota de 100 µL da solução estoque do fármaco contendo DES $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi adicionada em 5 mL de tampão BR pH 7 e, em seguida, sucessivas adições da solução estoque do DES puro, e respectivas leituras voltamétricas foram feitas.

Utilizando a mesma metodologia, foi determinada MDP em amostra comercial de Aldomete[®]. Entretanto, para este caso foi feita uma adição de 50 µL como contaminação inicial e adições de mesmo volume para a obtenção da curva de recuperação.

Para a determinação em água natural, uma solução contendo $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de DES foi preparada utilizando água coletada do açude de baturité, açude que faz parte da Bacia Metropolitana e se localiza no município de Baturité no estado do Ceará. Uma alíquota de 100 µL desta amostra foi adicionada a 5 mL de tampão BR pH 7 e feita a recuperação da mesma forma como descrita nos procedimentos anteriores. Para determinação de MDP foi feito o mesmo procedimento, porém, foi utilizada água oriunda do açude Santo Anastácio, localizado no Campus do Pici.

A utilização dos diferentes efluêntes teve como objetivo avaliar a influência da qualidade de água utilizada na metodologia. A água oriunda do açude Santo Anastácio recebe descarte de esgoto doméstico ao longo de sua margem. Desta forma, possivelmente um maior número de interferentes podem estar presentes e causar uma diferença nos valores de recuperação obtidos. O açude de Baturité não apresenta um nível de interferência humana tão alto, apresentado menor volume de poluição, que possivelmente dificultariam a recuperação do fármaco em estudo.

Por fim, foi feita a recuperação do DES e MDP em meio de urina sintética utilizando uma formulação já previamente descrita na literatura, Tabela 2.⁴⁴ Como relatado anteriormente, uma fração considerável dos fármacos são lançados nos efluêntes, por meio da urina, na sua forma inalterada, sendo assim, é importante que seja possível detecta-los neste meio com uma boa precisão.

Tabela 2 - Composição da solução de urina sintética.

Composição	Concentração / g L ⁻¹
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,103
NaCl	2,925
Na ₂ SO ₄	2,25
KH ₂ PO ₄	1,40
KCl	1,60
NH ₄ Cl	1,00
Ureia	25,00

Fonte: Journal Cristal Growth 233 (2001) 367-374.

3.4.6.3 Comparação com a técnica de Uv-Vis

A técnica de Uv-Vis foi utilizada para avaliar a exatidão das metodologias desenvolvida para o DES e MDP.

Para a molécula de DES, uma curva analítica foi feita em meio aquoso na faixa de concentração de $3,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. E as recuperações feitas em eletrólito suporte, fórmulação farmacêutica e água.

Para a molécula de MDP, uma curva analítica foi feita em meio de HCl 0,1 mol L⁻¹ na faixa de $7,40 \times 10^{-7}$ a $3,70 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. As recuperações foram feitas em fórmulação farmacêutica, urina sintética e água.

3.4.8 Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados experimentais obtidos no desenvolvimento da rotina analítica foram tratados matematicamente utilizando parâmetros estabelecidos na literatura.

Primeiramente foram feitos os cálculos do limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) obtido a partir das curvas analíticas. O método utilizado foi o estabelecido pela ANVISA, onde se utiliza o desvio padrão do intercepto⁴⁵. Este método garante parâmetros analíticos mais exatos. Para todo o tratamento estatístico dos resultados utilizou-se um limite de confiança de 95%.

Em todo o trabalho desenvolvido os valores de LD e LQ foram calculados de acordo com as equações 1 e 2.

$$LQ = 3x \frac{S_e}{s} \quad (1)$$

$$LD = 10x \frac{S_e}{s} \quad (2)$$

Onde: “ S_e ” é o desvio padrão do intercepto da curva analítica e “ s ” é o coeficiente angular da curva analítica.

A precisão da metodologia foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD), aplicando-se a equação 3.

$$RSD = \frac{S_b}{\bar{X}} \times 100 \quad (3)$$

Onde “ S_b ” é o desvio padrão da corrente de pico voltamétrico e “ \bar{X} ” é a média dos valores de corrente medidas.

Os testes de recuperação foram utilizados para avaliar a seletividade e eficiência da metodologia desenvolvida. Além disto, pode dar indícios de interferência causada pela complexidade da matriz.

O método gráfico foi utilizado para obter o valor adicionado ao eletrólito (contaminação adicionada inicialmente à matriz), pela extrapolação da curva de adição de padrão para $y = 0$, sendo o valor de “ x ” a quantidade recuperada⁴⁶. A taxa de recuperação foi calculada a partir da equação 4.

$$\%Rec. = \frac{[recuperada]}{[adicionada]} \times 100 \quad (4)$$

Quando utilizada formulação farmacêutica utiliza-se como base para a quantidade adicionada o valor que o fabricante informa da quantidade de princípio ativo presente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo traz um estudo eletroquímico e eletroanalítico das moléculas de dietilestilbestrol e metildopa, moléculas de interesse comercial e ambiental que podem causar prejuízos a saúde humana. Os estudos foram feitos com o fim de caracterizar eletroquimicamente o comportamento destas moléculas em meio aquoso e propor uma metodologia simplificada para sua detecção e quantificação em diferentes matrizes. Os estudos foram desenvolvidos sobre superfície de carbono vítreo. Além disto, foram realizados cálculos químico-quânticos para auxiliar na determinação do mecanismo redox desses compostos.

4.1 Dietilestilbestrol

4.1.1. Caracterização Eletroquímica

4.1.1.1 Estudo do Eletrólito de Suporte

Estudos preliminares foram feitos utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada para obter o perfil voltamétrico e determinar em qual eletrólito obtém-se uma melhor resposta redox e maior valor de corrente de pico.

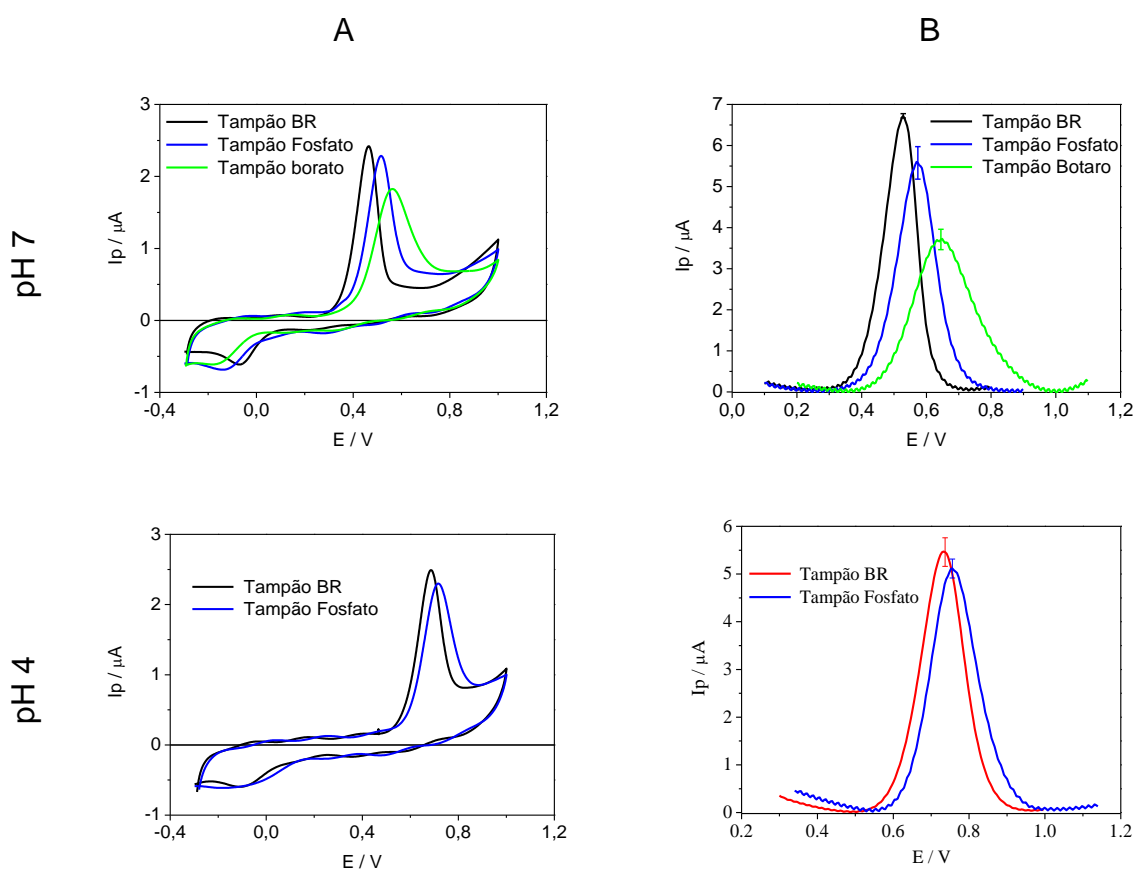
Os eletrólitos avaliados e suas respectivas concentrações e pH se encontram no sub-tópico 3.4.3.

Os experimentos foram feitos em cada eletrólito suporte relacionado, com uma concentração de DES de $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando a técnica de VC com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e VOQ, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Os resultados obtidos por voltametria cíclica mostraram, em todos os eletrólitos e pHs estudados, a presença de um processo redox, um pico de oxidação bem definido em torno de $0,5 \text{ V}$ e outro de redução menos pronunciado em torno de $-0,1 \text{ V}$, Figura 5A.

Analisando o conjunto de resultados obtidos, observou-se que todos os perfis obtidos em diferentes eletrólitos apresentaram característica de processo irreversível, ou seja, com um ΔE_p maior que 59 mV e razão intensidade de corrente de pico catódico e anódico diferente de 1. Além disto, observou-se um deslocamento dos potenciais de pico anódico e catódico nos diferentes eletrólitos, sendo o tampão BR o que apresentou a menor diferença de potencial (ΔE_p).

Figura 5 - Voltamogramas cíclicos (A) e Voltamogramas de onda quadrada (B) para DES $1,9 \times 10^{-5}$ sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ todos em pH 7,0 e tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0. (A) $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, (B) $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

Por voltametria de onda quadrada apenas o processo anódico, sinal mais intenso, foi estudado. Foi observado que o tampão BR apresentou melhor desempenho

frente aos demais eletrólitos, apresentando um processo mais seletivo e em potencial mais negativo. O tampão borato apresentou o pior desempenho por mostrar um processo “largo” e em potencial mais positivo. Além disto, a barra de erro dos voltamogramas mostrou que em tampão BR há uma melhor repetibilidade do sinal analítico. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 5B.

Os resultados obtidos mostraram que o processo redox do DES apresentou maior sensibilidade relativa e melhor repetibilidade em meio de tampão BR, sendo este, então, o mais adequado para os estudos eletroquímicos e desenvolvimento da metodologia eletroanalítica.

4.1.1.2 Estudo do pH do meio

A molécula de DES apresenta dois grupos fenólicos em sua estrutura. Em meio aquoso, o composto entra em equilíbrio com suas espécies iônicas pela dissociação ácida, e a natureza das espécies majoritárias em solução podem influenciar diretamente no potencial redox da molécula.

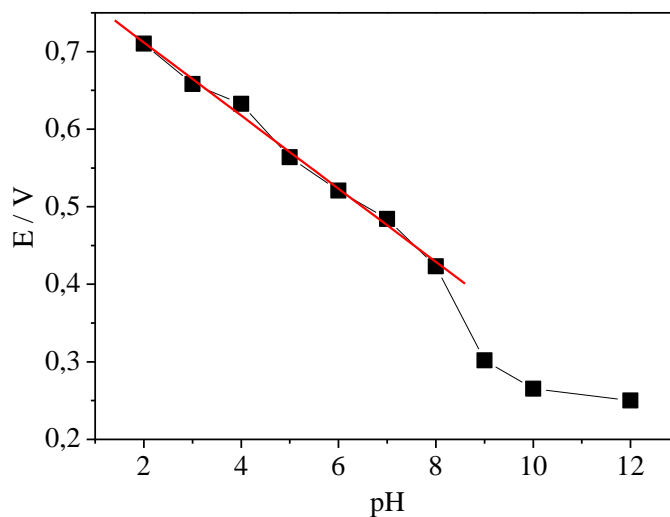
Após a escolha do tampão BR como eletrólito suporte para o estudo do DES, um estudo da influência da concentração hidrogeniônica na resposta redox do analíto foi feito. Para isto, o pH do tampão BR foi variado de 2 a 12 e a técnica de voltametria cíclica foi empregada para a avaliação do DES.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em cada pH foram tratados, e os valores de potencial de pico versus pH estão apresentados na Figura 6.

A relação entre E_p vs pH apresentou uma relação linear ($R = 0,997$) na faixa de pH de 2 a 8. Este comportamento é característico de processos que envolvem etapa de desprotonação antes da etapa eletroquímica.⁴⁷ A relação linear está representada pela equação 5.

$$E_{pico}(V) = 0,81 - 0,05 pH \quad (5)$$

Figura 6 - Relação entre o potencial de pico versus o pH para a oxidação do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

Utilizando o valor da inclinação da reta de E_{pico} vs. pH (equação 5) é possível calcular o número de prótons envolvidos na reação utilizando a equação 6.⁴⁸

$$\frac{dE_{\text{pico}}}{dpH} = \frac{-2,303RTm}{nF} \quad (6)$$

sendo que m é o número de prótons, R é a constante dos gases, T a temperatura, F a constante de Faraday e n número de elétrons. Substituindo o valor da inclinação de $0,05 \text{ V / pH}$, $F = 96500 \text{ C mol}^{-1}$, $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e $T = 298 \text{ K}$ na equação acima descrita, obteve-se uma relação entre o número de prótons e elétrons que participam da reação (m/n) igual a $0,85$, valor próximo de 1 . Este valor leva a concluir que o mecanismo redox do DES depende de uma etapa de desprotonação da molécula.

Uma segunda região, destacada pela perda de linearidade na relação E_p vs pH, entre o pH 8 e 10 , pode ser vista, Figura 6. Segundo *Compton*⁴⁸, processos voltamétricos de compostos orgânicos em meio aquoso apresentam uma dependência

direta com o pH do meio, e o ponto onde ocorre a mudança de inclinação na relação E_p versus pH indica o pK_a da espécie estudada.

A Figura 6 mostrou que não há uma mudança de coeficiente angular bem definida. Este fato pode estar associado à sobreposição dos dois valores de pK_a da molécula, que são muito próximos.

A fim de esclarecer melhor essa questão, cálculos teóricos foram feitos para estimar o pK_a do DES.

A Figura 7 apresenta o gráfico de α (percentual de espécies em função do pH) versus pH obtido pelo programa Marvin-Beans. 5.3.2⁴⁹ e as respectivas estruturas estáveis em cada pH.

Foi possível observar que com a variação do pH do meio três estruturas podem estar presentes em solução. A curva em preto mostra o percentual de moléculas de DES na sua forma neutra, a curva em vermelho mostra o percentual de moléculas após perder um dos hidrogênios das hidroxilas e a curva em verde mostra a molécula totalmente desprotonada.

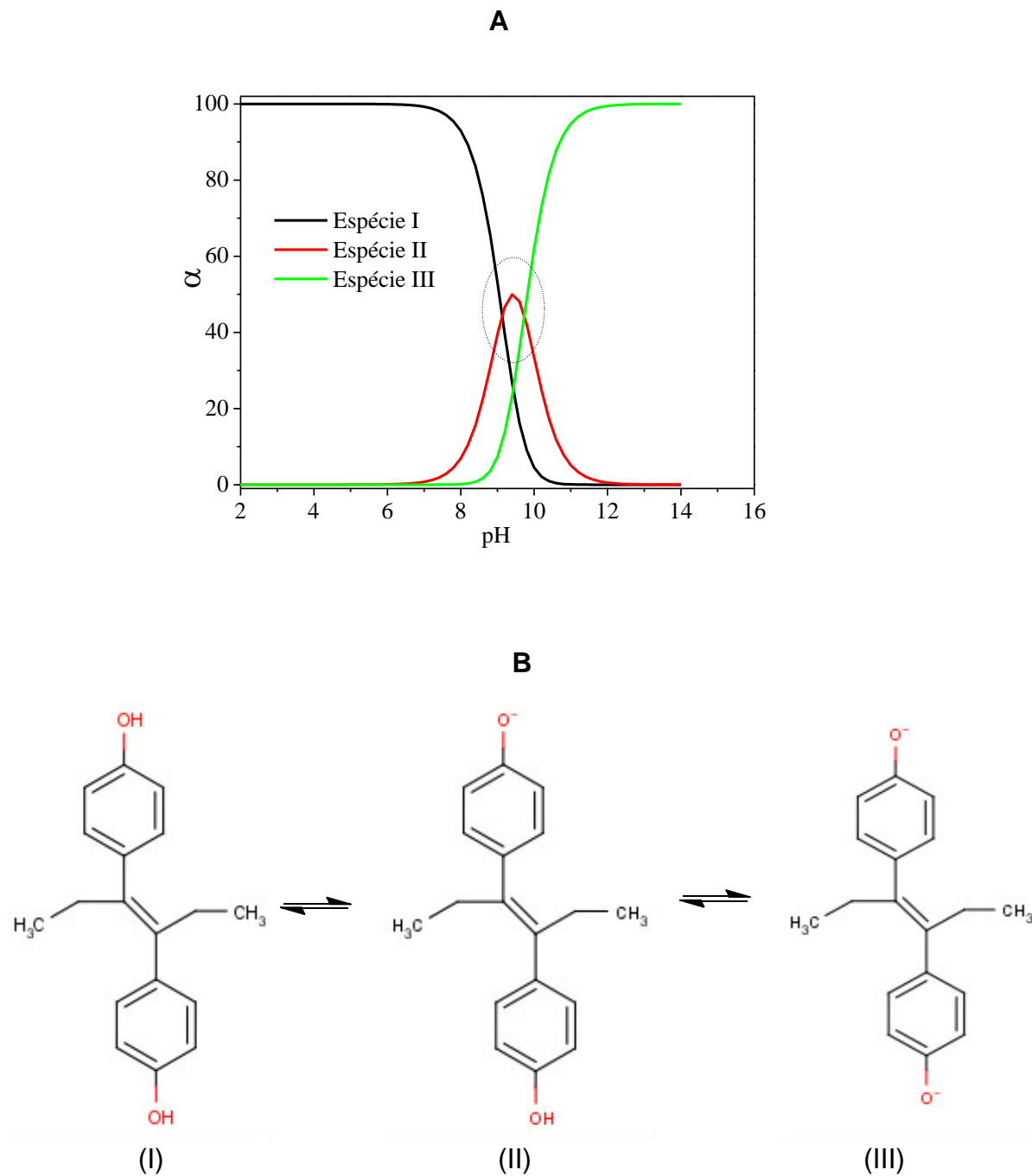
Em pH 9,13 observou-se que a concentração das espécies I e II apresentam α em torno de 50%, estando estas espécies em um equilíbrio de desprotonação sendo possível dizer que o valor de pH é igual ao primeiro pK_a da molécula. Da mesma forma ocorreu em pH 9,73, que revela a equivalência molar das espécies II e III no equilíbrio, sendo desta forma, o valor de pH igual ao segundo pK_a da molécula

A partir do gráfico foi obtido que os valores de pK_a para a molécula de DES são 9,13 e 9,73, o que está de acordo com a faixa de valores observados experimentalmente.

Desta forma, os dados experimentais e teóricos em concordância levam a conclusão de que o valor de pK_a mais adequado para o DES está em torno de 9. Este valor de pK_a mais provável explica a distorção observada no gráfico da Figura 6.

O pK_a de um fenol tem um valor em torno de 10, entretanto, substituintes retiradores de elétrons podem provocar uma redução no valor de pK_a . Isto se deve pela dificuldade que o anel terá em estabilizar a carga do íon fenóxido após a desprotonação, tornando o fenol mais ácido.⁵⁰

Figura 7 - A) Gráfico de α versus pH para a molécula de DES, obtido a partir dos cálculos computacionais. B) Estruturas do DES em função do pH do meio.



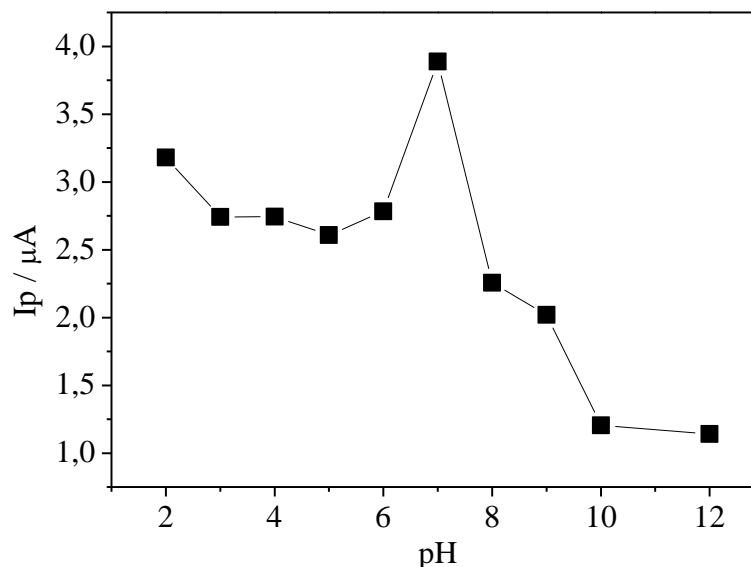
Fonte: O próprio autor.

Para fins analíticos, um estudo dos valores de corrente de pico, obtidas dos voltamogramas cíclicos, versus pH foi feito e está apresentado na Figura 8. O resultado mostrou que houve uma diminuição da corrente de pico com o aumento do pH da solução.

Segundo a literatura,^{51,52} o mecanismo redox de moléculas com grupos fenólicos apresentam uma etapa de desprotonação, que seria favorecida em pH mais alcalino, isto diminuiria a energia do processo redox da molécula de DES. Entretanto, em termos quantitativos, houve uma redução da corrente de pico após um valor máximo em pH 7. Este fato, possivelmente, está relacionado à natureza das espécies em equilíbrio na solução.

Por apresentar o maior valor de corrente de pico, o pH 7 foi empregado nas etapas seguintes de caracterização do processo redox e determinação eletroanalítica do DES.

Figura 8 - Relação entre a corrente de pico contra o pH para a oxidação do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

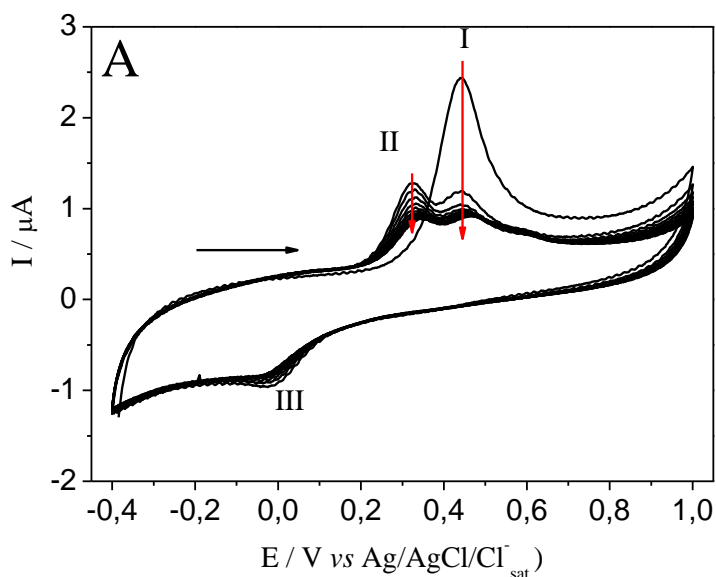
4.1.2. Caracterização Voltamétrica

4.1.2.1 Número de ciclos e potencial de inversão

Estudos de voltametria cíclica foram realizados a fim de obter informações a cerca do processo redox da molécula de DES. Primeiramente, foi feito um estudo de número de ciclos voltamétricos para avaliar a repetibilidade do processo sobre o eletrodo de carbono vítreo.

A Figura 9 apresenta 15 cíclicos voltamétricos para o DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo. Os voltamogramas foram registrados em velocidade de 100 mV s^{-1} em uma faixa de potencial de $-0,4$ a $1,0 \text{ V}$.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos para 15 ciclos consecutivos de oxiredução do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

O primeiro ciclo voltamétrico mostrou a presença de um processos redox, como já observado anteriormente. Um pico de oxidação (pico I) em 0,450 V e outro de redução (pico III) em 0,021 V. Na sequência, no segundo ciclo voltamétrico, foi observado o surgimento de um segundo processo de oxidação (pico II) em 0,320 V.

A corrente do processo de oxidação (pico I) apresentou uma sensível diminuição do seu valor a partir do segundo ciclo. Este fato pode ser explicado pela adsorção do produto da reação de oxidação do DES, que bloqueia os sítios ativos do eletrodo diminuindo a sua área ativa exposta, que por sua vez reduz a quantidade de material que é oxidado, reduzindo os valores de corrente. O comportamento adsortivo observado é característico de compostos fenólicos.⁵³

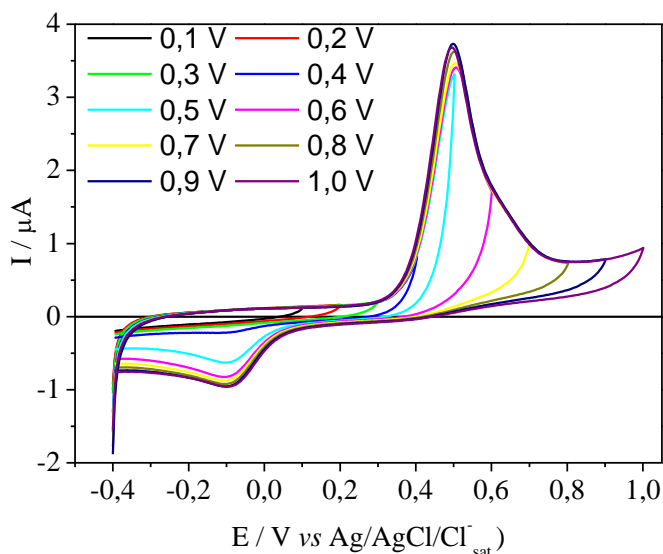
Com a evolução dos ciclos voltamétricos observou-se o aparecimento de um pequeno “ombro” em valores mais positivos, aproximadamente 0,6 V. Segundo a literatura,^{54,55} compostos que contém grupos fenólicos podem sofrer reações de dimerização, já que uma etapa de formação de radical estaria presente no mecanismo reacional destes.

A Figura 9 mostrou claramente que existe adsorção do produto à superfície do eletrodo, e este fato pode facilitar a reação de dimerização que geralmente ocorre com adsorção de produto reacional ao substrato.

A molécula de DES apresenta em sua estrutura dois sítios passíveis de reação química. Um deles está nos grupos fenólicos, provável grupo a sofrer oxidação, o outro seria a dupla ligação conjugada aos anéis fenólicos, que seria um possível sítio de redução da molécula.

Com o objetivo de investigar a atribuição dos processos de oxidação e redução do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi feito um estudo do potencial de inversão da voltametria cíclica. A Figura 10 apresenta os voltamogramas cíclicos em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo para a variação do potencial de inversão em sentido anódico (0,1 a 1,0 V).

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos para o DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo, variando o potencial de inversão no sentido anódico de: 0,1 V a 1,0 V.



Fonte: O próprio autor.

Foi possível observar que entre os potenciais de inversão de 0,1 V a 0,3 V não houve corrente de oxidação ou redução, provavelmente, devido a estes potenciais não possuírem energia suficiente para oxidar ou reduzir grupos da molécula em estudo.

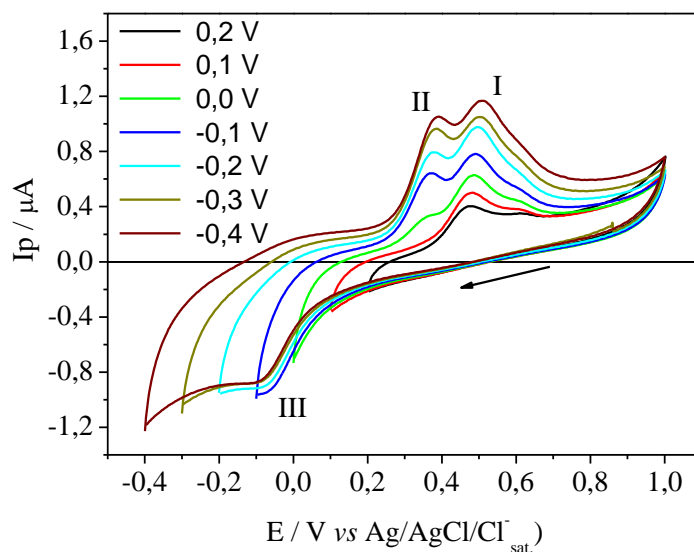
Quando a varredura atingiu os potenciais de 0,4 V observou-se uma corrente de oxidação e na varredura inversa uma corrente de redução. As correntes de redução aumentaram gradativamente até o potencial de 0,8 V e se mantiveram constantes até o potencial de 1,0 V.

Da mesma forma, foi feito um estudo de potencial de inversão, agora no sentido catódico, variando o potencial de 0,2 V a -0,4 V para investigar a dependência do pico II, com o processo de redução pico III, Figura 11.

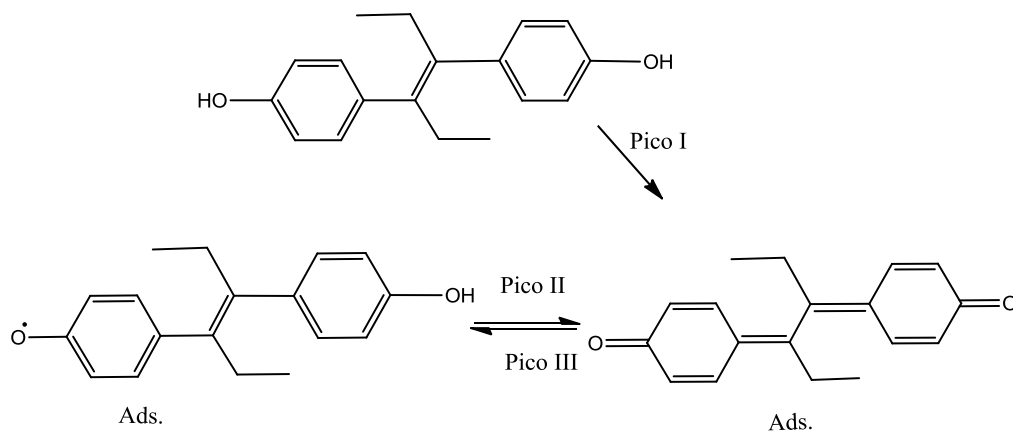
O pico I corresponde ao processo principal já evidenciado com a oxidação direta do DES sobre a superfície eletródica. Para os potenciais de inversão 0,2 V e 0,1 V não foi possível observar o pico II, entretanto, em potenciais de inversão mais negativos, a partir de 0,0 V, foi possível observar uma corrente de redução do DES, no

sentido catódico, e como consequência, no sentido anódico, o aparecimento do pico II, mostrando que o processo visto no pico II depende da formação do produto gerado no pico III.

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos para o DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre carbono vítreo, variando o potencial de inversão no sentido catódico de: 0,2 V a -0,4 V.



Esquema 1: Reação redox do DES sobre a superfície de carbono vítreo.



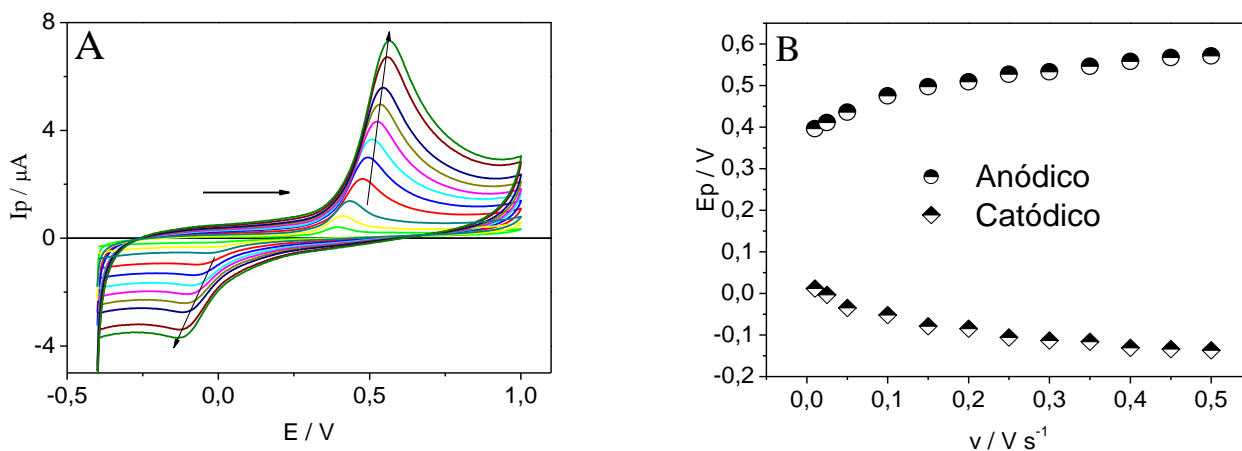
Fonte: O próprio autor.

O estudo do potencial de inversão permitiu concluir que o processo de redução observado trata-se de um par redox, possivelmente quinona-hidroquinona, envolvido no processo voltamétrico, Esquema 1.

4.1.2.2 Estudo da velocidade de varredura e avaliação dos critérios de diagnóstico voltamétricos

Um estudo voltamétrico variando a velocidade de varredura foi feito para verificar parâmetros relacionados à cinética de transferência de carga no processo redox do DES sobre carbono vítreo. A Figura 12A apresenta os voltamogramas cíclicos, 1º ciclo, em diferentes velocidades de varredura para a oxiredução de DES em meio de tampão BR (pH 7) sobre a superfície de carbono vítreo. O estudo foi feito na faixa de potencial de -0,4 a 1,0 V, utilizando uma solução $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a variação da velocidade de varredura se deu no intervalo de 0,01 a 1 V s^{-1} .

Figura 12 - A) Voltamogramas cíclicos referentes ao 1º ciclo e variando a velocidade de varredura de 10 a $0,5 \text{ V s}^{-1}$ para a oxiredução do DES $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo. B) Relação ente o potencial de pico e a velocidade de varredura para o DES em meio de tampão BR pH7.



Fonte: O próprio autor.

Foi possível observar a presença de um processo anódico e um processo catódico sobre o carbono vítreo em todas as velocidades estudadas. Com o aumento da velocidade de varredura, os potenciais de pico de oxidação se deslocaram para valores mais positivos e o de redução para valores mais negativos.

O ΔE_p variou de um valor de 0,4 V até cerca de 0,7 V, como pode ser visto na Figura 12B, que mostra a relação entre o potencial de pico anódico e catódico contra a velocidade de varredura. Este resultado dá indícios de um processo quase reversível.

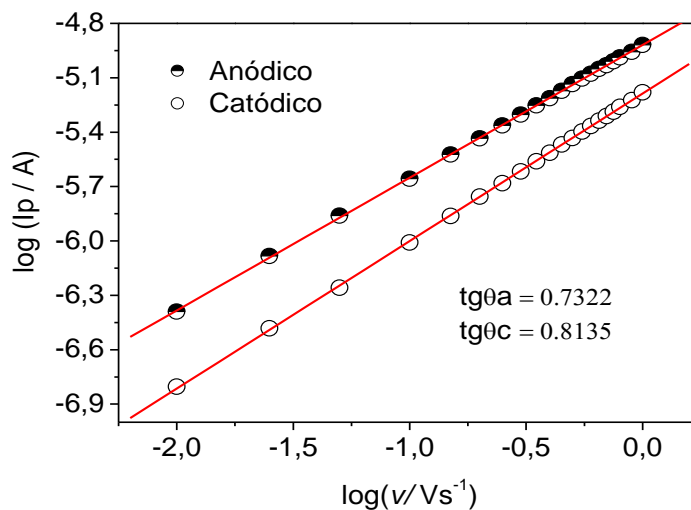
O aumento do ΔE_p com aumento da velocidade de varredura pode estar relacionado a uma cinética relativamente lenta da reação redox da espécie em questão. Além disso, a passivação da superfície do eletrodo pode acarretar em uma barreira de energia extra que dificulta ou até mesmo impede a transferência eletrônica nas reações redox, deslocando-as no sentido de processos mais energéticos.

A partir dos valores de corrente de pico obtidos em diferentes velocidades de varredura foi grafada a correlação entre o logaritmo da corrente de pico versus o logaritmo da velocidade de varredura para os processos de oxidação e redução da molécula de DES sobre superfície de carbono vítreo, Figura 13.

Segundo *David K. Gosser Jr.*⁵⁶, a resposta eletroquímica envolvendo adsorção de espécies é caracterizada por uma simetria entre as correntes anódicas e catódicas, sendo assim, a partir da relação do logaritmo da corrente de pico (I_p) vs velocidade de varredura (v) podemos obter dados quantitativos sobre a natureza dos processos estudados. O diagnóstico acima descrito diz que processos controlados por adsorção tem uma correlação linear com um coeficiente angular igual a 1 para o gráfico de $\log(I_p)$ vs $\log v$, enquanto os processos difusionais tem coeficiente angular de 0,5.

Os dados obtidos graficamente apresentaram uma inclinação de aproximadamente 0,73 e 0,81 para o processo anódico e catódico, respectivamente. Sendo assim, os valores obtidos experimentalmente dão indícios de processos controlados por adsorção tanto para a reação catódica quanto para a reação anódica.

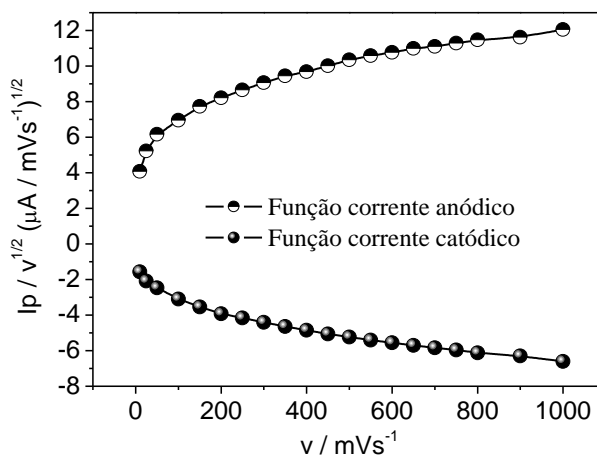
Figura 13 - Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura, para o DES em tampão BR pH 7, sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

A Figura 14 apresenta a correlação encontrada entre a função corrente e a raiz quadrada da velocidade de varredura. Utilizando os critérios de Nicholson-Shain⁵⁷ foi possível caracterizar o tipo de mecanismo presente no processo redox estudado.

Figura 14 - Correlação entre a função corrente ($I_p/v^{1/2}$) e a velocidade de varredura (v) para os processo de oxidação e redução da molécula de DES sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

De acordo com o perfil encontrado na Figura 14 o processo de oxidação e redução da molécula de DES sobre superfície de carbono vítreo obedece ao mecanismo descrito no caso VII dos critérios de Nicholson-Shain, sendo um processo catalítico com transferência reversível de carga.

4.1.3. Estudo computacional do mecanismo redox do DES

Com o intuito de obter mais informações quanto à oxidação do DES foram feitos estudos químico-quânticos utilizando modelos computacionais adequados.

Os estudos eletroquímicos mostraram o pH 7 como o valor mais promissor para a quantificação do DES, sendo este utilizado para os demais estudos e proposta mecanística. Desta forma, os cálculos computacionais foram feitos a partir da estrutura do DES correspondente ao pH 7, como foi mostrada na Figura 7 anteriormente.

O estudo químico computacional da molécula de DES é constituído do cálculo dos parâmetros moleculares do DES e utilização destas para determinar as etapas do mecanismo redox da molécula.

Como primeiro cálculo foi feita uma análise conformacional do DES. Para tanto, foi utilizado o software forcite com campo de força *Universal*. Foram feitos 250 ciclos de “*annealing*” cada um com 5 rampas de aquecimento e 100 passos dinâmicos por rampa, totalizando assim 125000 estruturas calculadas. Variou-se a temperatura entre 300 e 350 K e as cargas iniciais foram atribuídas pelo campo de força.

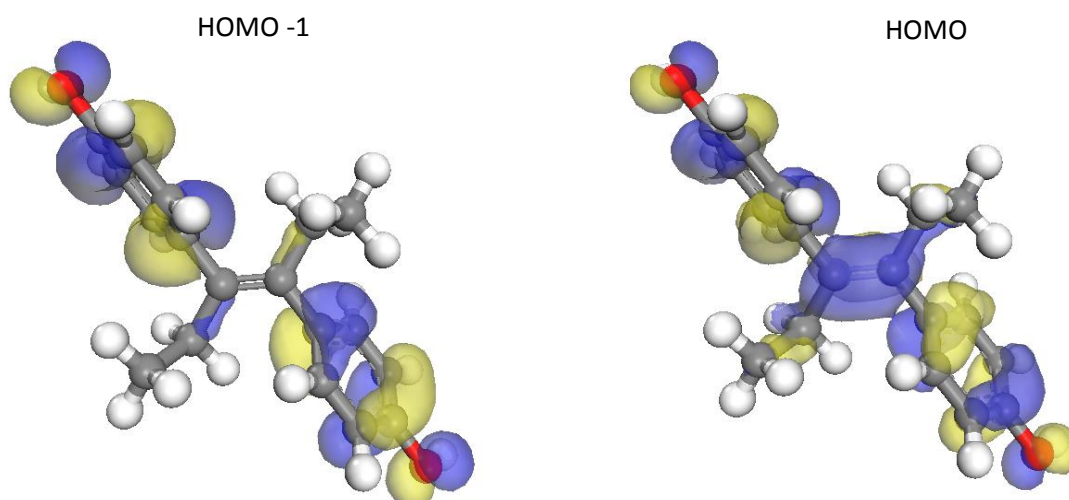
Após o cálculo conformacional foi feita a geometrização das estruturas do DES na suas formas “cis” e “trans”. Neste caso foi obtido a estrutura “trans” como mais estável, sendo esta, usada para cálculos posteriores.

Após a geometrização foi feito um cálculo de densidade eletrônica do orbital molecular mais alto ocupado (do inglês *highest occupied molecular orbital*, HOMO) e do orbital molecular mais baixo desocupado (do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO). A energia do orbital HOMO mede o caráter elétron-doador e o orbital LUMO o caráter elétron-aceitador de um composto ou grupo característico.

Como o processo eletroquímico principal estudado para o DES foi a oxidação, apenas o orbital HOMO foi analisado, já que este representa a região da molécula mais favorável a perder elétrons.⁵⁸

A Figura 15 apresenta os orbitais HOMO -1 (orbital HOMO com energia ligeiramente menor que o HOMO) e HOMO para a molécula de DES neutra no estado fundamental, forma em que esta se apresenta em pH 7.

Figura 15 - Orbitais HOMO -1 e HOMO para a molécula de DES.



Fonte: O próprio autor.

Foi possível observar que os orbitais HOMO estão localizados sobre a dupla ligação central, sobre os anéis aromáticos e sobre os oxigênios e os orbitais HOMO-1 estão sobre os anéis aromáticos e oxigênios, indicando as regiões com maiores densidades eletrônicas e mais prováveis de sofrer oxidação.

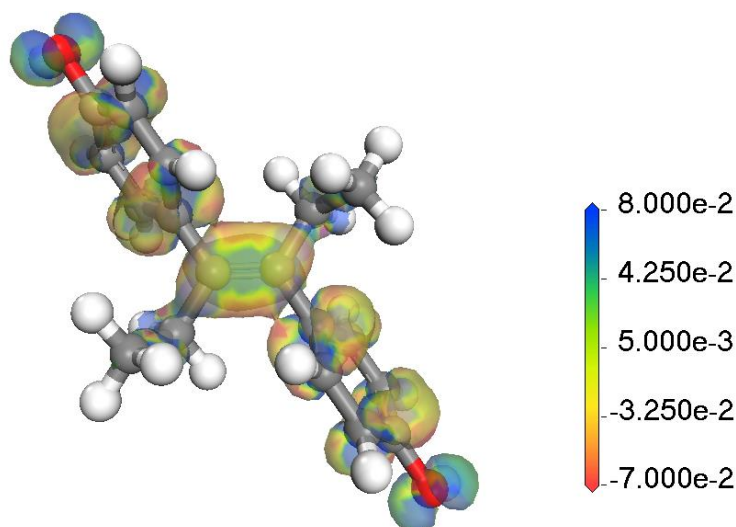
As energias calculadas dos orbitais HOMO-1 e HOMO foram -5.429 eV e -4.918 eV, respectivamente. Sendo a diferença de energia destes orbitais maior que a energia de ordem térmica que é de 0.026 eV, conclui-se que as transições eletrônicas ocorrem apenas no orbital HOMO. A energia de ordem térmica é a energia térmica necessária para haver uma mudança na estrutura da molécula. Se a diferença de energia entre os orbitais HOMO e HOMO -1 for menor que esta energia a mudança na

molécula favorece a saída de elétrons de ambos os orbitais, o que não foi visto neste caso.

Cálculos de densidade eletrônica da molécula de DES foram feitos para mostrar como a densidade de carga está distribuída sobre os átomos e ligações da molécula de DES.

A Figura 16 apresenta a distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO na molécula de DES. Observando a distribuição de cores e a escala representativa de energia pode-se ver que os sítios com maior volume de densidade eletrônica estão sobre os oxigênios, sendo estes os prováveis pontos de oxidação.

Figura 16 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de DES.



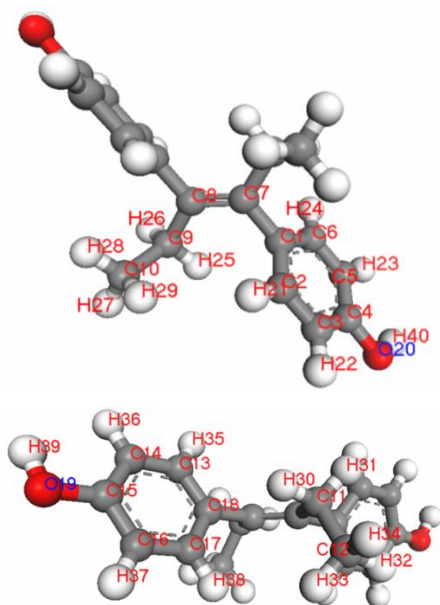
Fonte: O próprio autor.

A Figura 17 apresenta a estrutura molecular geometrizada do DES com as respectivas identificações numéricas dos átomos e a Tabela 3 apresenta os valores de cargas de Mulliken para os átomos na molécula de DES.

As cargas de Mulliken representam uma atribuição populacional de carga calculada para cada átomo. Apesar de apresentar limitações é uma ferramenta muito eficiente para determinação de prováveis sítios de oxidação e redução.^{59,60}

Na Tabela 3 é possível observar que os átomos de oxigênio 19 e 20 apresentam as maiores densidades de carga, -0,507 para ambos, o que indica estes como os sítios mais favoráveis para doar elétrons em uma reação química.

Figura 17 - Representação da estrutura tridimensional geometrizada da molécula de DES em duas perspectivas diferentes.



Fonte: O próprio autor.

Tabela 3 - Valores das cargas de Mulliken calculadas para os átomos numerados na estrutura.

Cargas Atômicas de Mulliken	
C 1	0.077
C 2	-0.082
C 3	-0.124
C 4	0.338
C 5	-0.128
C 6	-0.094
C 7	0.031
C 8	0.031
C 9	-0.150
C 10	-0.170
C 11	-0.152
C 12	-0.168
C 13	-0.094
C 14	-0.129
C 15	0.339
C 16	-0.123
C 17	-0.083
C 18	0.078
O 19	-0.507
O 20	-0.507

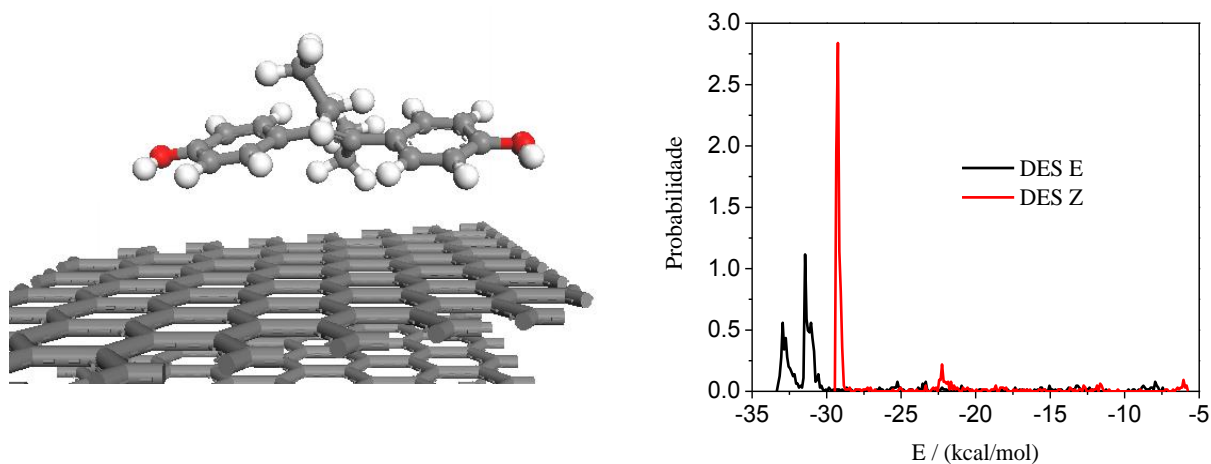
Além disto, é possível observar que os átomos de carbono da dupla ligação, C7 e C8, apresentam uma carga atribuída alta, 0,031 para ambos. Este valor mostra que os átomos da dupla ligação possuem uma baixa probabilidade de sofrer oxidação, confirmando o que foi visto nos experimentos eletroquímicos do tópico 4.1.2.1, onde dados voltamétricos mostraram que a dupla ligação não sofre reação.

Os resultados observados mostraram uma correlação com os obtidos nas medidas eletroquímicas indicando que a proposta de mecanismo está adequada, sendo os oxigênios das hidroxilas os mais prováveis sítios de reação. Além disto, os valores obtidos pelas cargas de Mulliken indicam uma baixa probabilidade de reação nos

carbonos da dupla ligação, dado este que também confirma os experimentos eletroquímicos.

Foi calculada a energia de adsorção da molécula de DES sobre uma superfície de grafeno a fim de determinar a adsorção desta sobre a superfície eletródica, Figura 18. Foi possível observar que a estrutura de geometria trans apresenta energia de adsorção variando de -30 a -33 kcal mol⁻¹, o que caracteriza uma adsorção física da molécula de DES sobre a superfície de carbono antes de haver reação de oxidação. Este resultado está em concordância com os experimentos eletroquímicos anteriores que indicaram um comportamento adsorativo da molécula de DES sobre o eletrodo de carbono vítreo.

Figura 18 - (A) Estrutura do DES adsorvida sobre a superfície de grafeno. (B) Cálculo da energia de adsorção da molécula de DES.



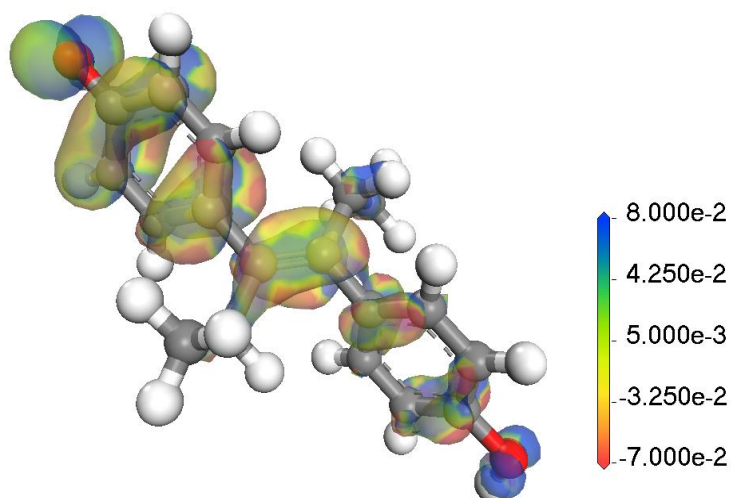
Fonte: O próprio autor.

Após a adsorção da molécula, o mecanismo proposto indica uma desprotonação seguida pela primeira transferência eletrônica, formando assim um radical. A Figura 19 apresenta a distribuição da densidade eletrônica para a molécula de DES após a interação com a superfície eletródica e perda de um próton e um elétron, formando um radical orgânico adsorvido.

É possível observar na Figura 19 que a maior densidade eletrônica do orbital HOMO ainda permanece sobre os oxigênios da molécula, entretanto houve uma

pequeno aumento de volume do orbital HOMO referente ao oxigênio radicalar, mostrando uma densidade eletrônica maior, sugerindo este como um sítio preferencial para saída do segundo elétron.

Figura 19 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de DES radicalar.



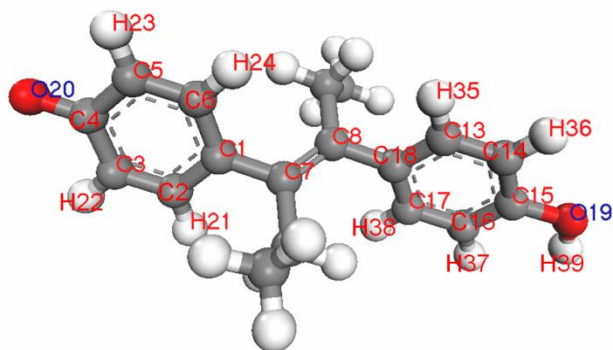
Fonte: O próprio autor.

A Figura 20 apresenta a estrutura geometrizada para a molécula de DES radicalar com as respectivas identificações numéricas dos átomos, e a Tabela 4 apresenta os valores de cargas de Mulliken para os átomos na molécula de DES.

Os valores de cargas de Mulliken apresentadas para os átomos de oxigênio na molécula de DES radicalar foram de -0,498 para o oxigênio ligado à hidrogênio e de -0,568 para o oxigênio radical. Desta forma, pode-se notar uma maior densidade de carga no oxigênio radical, indicando este sítio como o de mais provável saída do segundo elétron.

Após a completa oxidação do DES a molécula sofre um rearranjo a fim de reestabelecer a neutralidade e estabilidade, gerando uma molécula com dois grupos quinonas nas extremidades.

Figura 20 – Representação da estrutura tridimensional geometrizada da molécula de DES.



Fonte: O próprio autor.

Tabela 4 - Valores das cargas de Mulliken calculadas para os átomos da molécula de DES radicalar.

Cargas Atômicas de Mulliken	
C 1	0.088
C 2	-0.059
C 3	-0.097
C 4	0.329
C 5	-0.102
C 6	-0.063
C 7	0.056
C 8	0.053
C 9	-0.163
C 10	-0.162
C 11	-0.169
C 12	-0.161
C 13	-0.077
C 14	-0.113
C 15	0.348
C 16	-0.128
C 17	-0.079
C 18	0.075
O 19	-0.498
O 20	-0.568

Por fim, o cálculo das energias e das estruturas obtidas em cada etapa do mecanismo foi feito e a partir destes dados obteve-se um gráfico da variação de energia como o caminho da reação, que está mostrado na Figura 21.

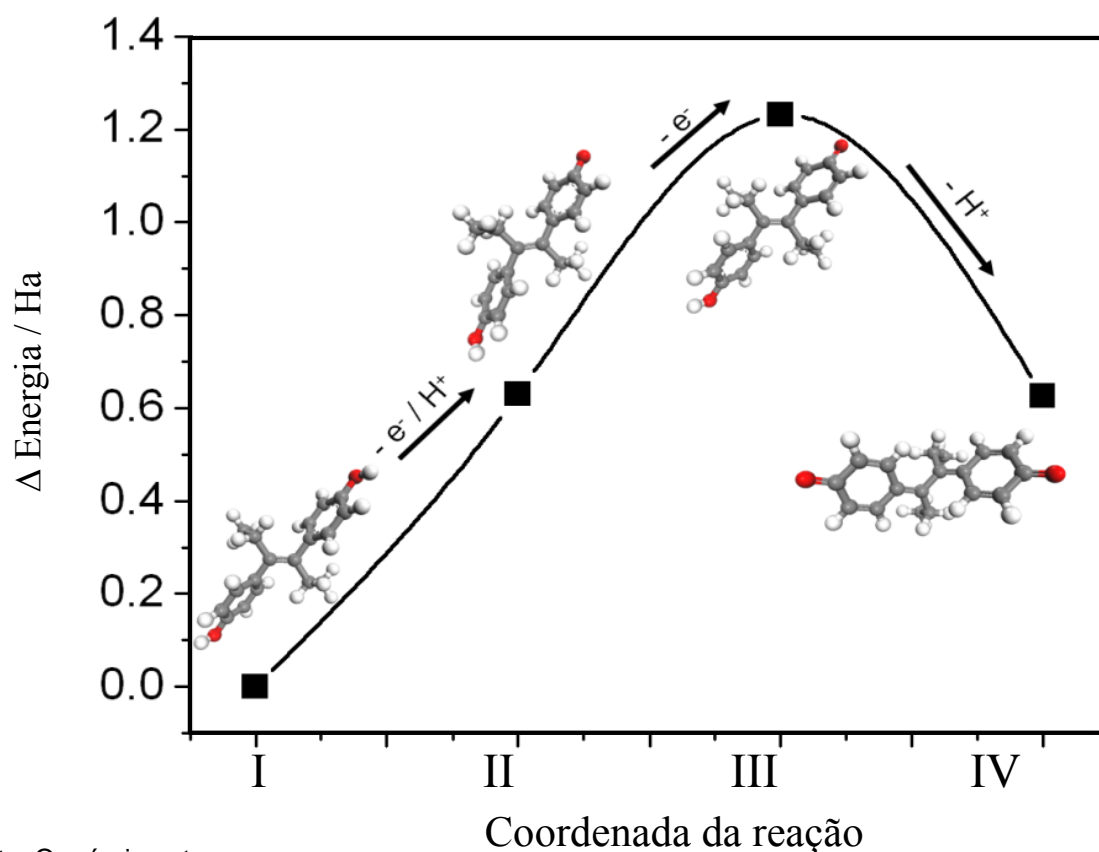
Foi possível observar que houve um aumento da energia da molécula de DES após a primeira etapa, desprotonação, perda do primeiro elétron e formação do radical orgânico. Em seguida, atingiu uma energia máxima após a saída do segundo elétron devido à desestabilização do anel aromático.

Por fim, um rearranjo da estrutura do DES pela ressonância dos elétrons π dos anéis aromáticos e da dupla ligação do grupo vinil, possibilitou um ganho de estabilidade da molécula que chegou a uma estrutura final de quinona pela saída do hidrogênio do fenol na extremidade oposta ao sitio de oxidação da molécula.

As etapas do mecanismo mostraram um ganho de energia e estabilidade relativa do produto proposto e demonstram a viabilidade da proposta mecanística

apresentada. É importante ressaltar que o produto reacional, apesar de mais estável, apresentou uma energia maior que a molécula de partida, mostrando que a oxidação do DES é um processo não espontâneo, sendo induzido eletroquimicamente. Sendo assim, os cálculos quânticos foram de grande valia para a conclusão do estudo de mecanismo.

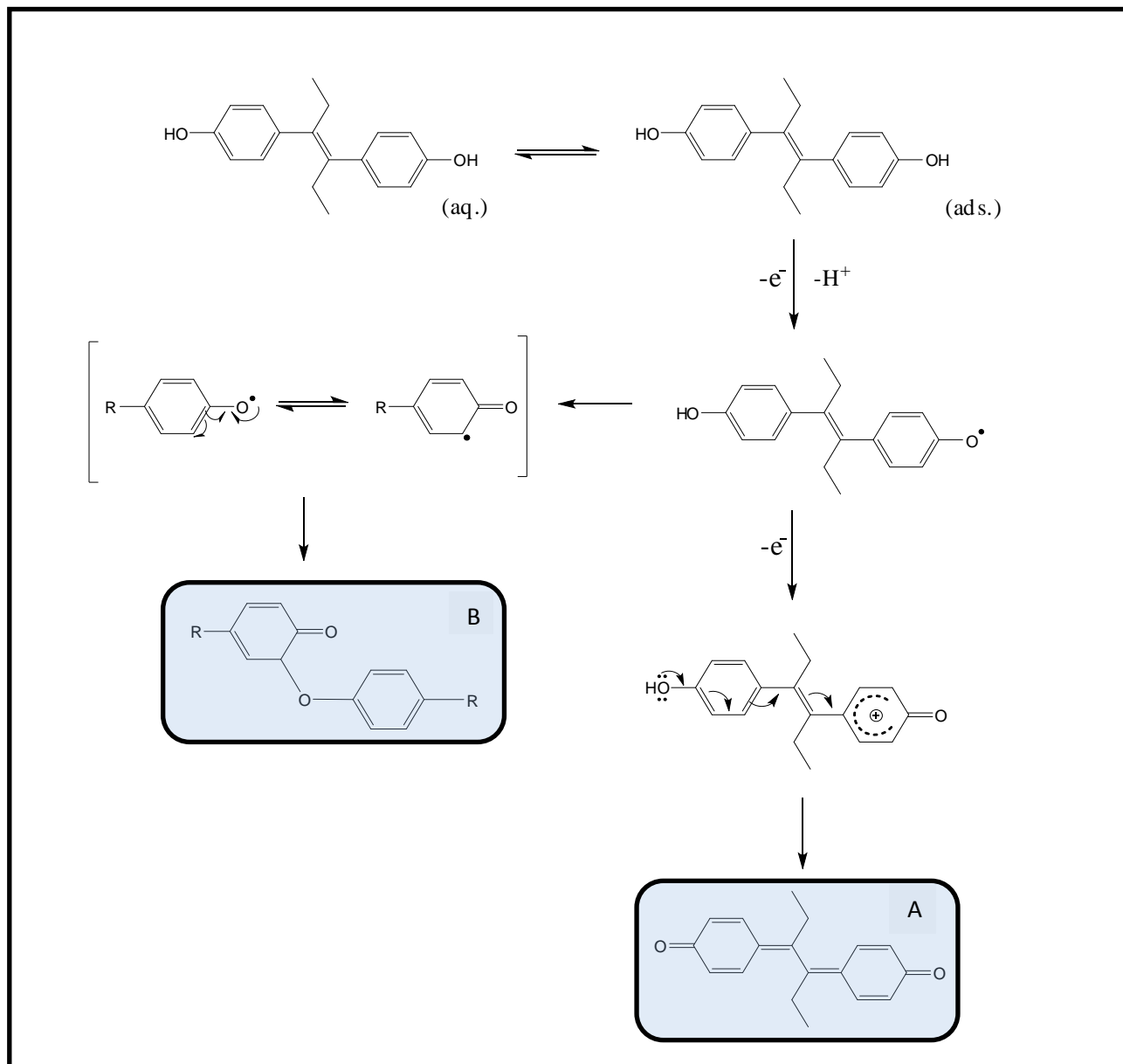
Figura 21 - Variação de energia das estruturas do DES em cada etapa do mecanismo redox.



Fonte: O próprio autor.

Considerando os dados experimentais obtidos por voltametria cíclica, os parâmetros analisados segundo os critérios estabelecidos na literatura e os resultados obtido nos experimentos computacionais, uma proposta de mecanismo redox foi elaborada e pode ser vista na Figura 22.

Figura 22 - Proposta de mecanismo redox do DES em meio de Tampão BR pH 7.



Fonte: O próprio autor.

Foi visto experimentalmente que o potencial da reação depende do pH do meio, sendo assim, como foi estabelecido o pH 7 para os estudos voltamétricos, a primeira etapa do mecanismo equivale a adsorção da molécula sobre a superfície eletródica e posterior desprotonação. Os dados computacionais também evidenciaram uma forte adsorção da molécula sobre superfície de carbono, seguida pela primeira

transferência eletrônica, produzindo um radical fenox, e uma segunda transferência eletrônica gerando uma quinona e produzindo uma deficiência de carga no anel. Esta deficiência eletrônica faz com que a molécula sofra um rearranjo tautomérico, levando a molécula à sua forma final com uma dupla quinona (composto A). As energias calculadas para as etapas do mecanismo proposto mostraram a viabilidade energética destas etapas, reforçando os dados voltamétricos. Por outro lado, uma possível mudança de mecanismo pode ocorrer levando a formação de um dímero (composto B) como é mostrado na rota reacional proposta na Figura 22 . Por voltametria cíclica foi possível observar evidências dessa reação.

4.1.4. Estudos de voltametria de onda quadrada

Os estudos anteriores mostraram que o DES é um composto fenólico que apresenta um pico de oxidação bem intenso, porém, seu produto de reação consiste na formação de quinona, que pode adsorver na superfície do eletrodo “mascarando” a resposta eletroquímica ou até mesmo bloqueando totalmente sítios ativos do eletrodo de trabalho. Estas características fazem dos compostos fenólicos, no caso mais especificamente estudado o DES, compostos de difícil determinação via eletroquímica, sendo necessárias condições adequadas para garantir um método com sensibilidade e precisão para a quantificação do mesmo.

Tendo em vista o observado, é de fundamental importância que seja feito um estudo das condições voltamétricas adequadas para a quantificação do DES.

A voltametria de onda quadrada é a técnica voltamétrica mais eficaz, para determinação eletroanalítica. A possibilidade de ajuste de condições como: frequência de aplicação de pulso (f), amplitude de potencial (a) e incremento de varredura (ΔE_s) fazem com que se potencialize a aquisição de resultados de cada sistema estudado, tornando o método bastante específico para cada analito.

Além de dados quantitativos, a VOQ possui um suporte matemático que permite determinarmos parâmetros qualitativos e quantitativos a respeito do mecanismo

redox de moléculas, como: número de prótons e elétrons que participam da reação, reversibilidade do processo e cinética reacional.

Assim, neste tópico serão estudados os parâmetros da VOQ adequados para aplicação na determinação do DES e parâmetros mecanísticos úteis para o entendimento de seu mecanismo redox.

4.1.4.1 Frequência de aplicação de pulso de potencial

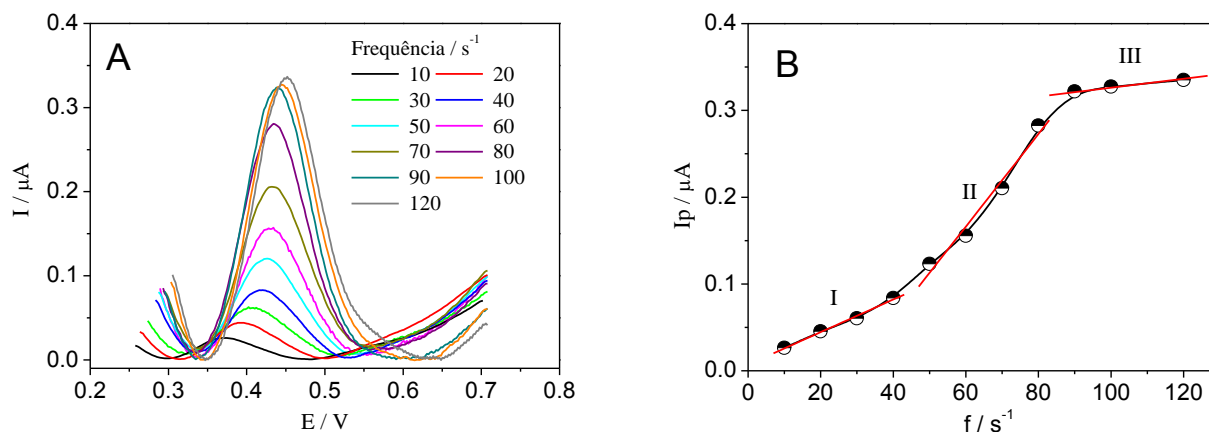
O primeiro parâmetro estudado foi a frequência de aplicação do pulso. Este parâmetro é o mais importante para a voltametria de onda quadrada, visto que combinado ao incremento de potencial é responsável por determinar a velocidade da varredura e por isso tem influência significativa no perfil e intensidade do sinal voltamétrico. Os dados obtidos a partir do estudo deste parâmetro possibilitam a discussão a cerca da cinética reacional e cálculo do número de elétrons.

A Figura 23 apresenta o estudo de frequência de pulso da onda quadrada para a oxidação do DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O estudo foi realizado variando-se a frequência aplicada de 10 a 120 s^{-1} , sendo que os valores de amplitude e incremento de potencial foram fixados em 50 mV e 2 mV, respectivamente, valores de referência tomados de acordo com Lovric⁴².

Com o aumento dos valores de frequência aplicada foi possível observar um aumento da corrente de pico do processo de oxidação, porém, não verificou-se uma correlação linear, como mostrado na Figura 23B. Esse comportamento dá indícios de processo quase reversível.⁴²

Em uma análise mais detalhada, destacam-se três regiões na curva experimental obtida. A primeira região, destacada na Figura 23B, está no intervalo de 10 a 40 s^{-1} , onde se observa uma menor inclinação da curva de corrente versus frequência de pulso aplicado.

Figura 23 – (A) Voltamograma de onda quadrada para oxidação do DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo, em diferentes frequências de aplicação de pulsos em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. (B): Relação entre a corrente de pico e a frequência de pulso. $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

É possível observar que em baixas frequências de pulso, consequentemente baixas velocidades, os potenciais redox são mais negativos o que pode ser um indicio da formação de outros produtos reacionais. Em baixas frequências favorecemos a formação de produtos de cinética mais lenta, nesse caso em estudo, baixas frequências podem favorecer a oxidação de outras formas de ressonância da estrutura do DES radical, sendo estas oxidadas em potenciais mais baixos.

A segunda região está no intervalo de 50 a 80 s⁻¹. Nesta houve um aumento mais expressivo da corrente com a variação da frequência. O aumento da inclinação é resultado da aplicação de potencial de forma mais rápida, desta forma o intermediário radicalar reage logo ao ser formado impedindo, ou pelo menos, minimizando a formação das estruturas de ressonância do DES.

Por último, a terceira região, de 80 a 120 s⁻¹, destacada na figura, mostra a estabilização da corrente de oxidação do DES, alcançada com o aumento da frequência. Neste caso, as altas frequências aplicadas promovem altas velocidades de varredura. Devido a diferença entre a velocidade de aplicação de pulso e a velocidade da reação, não se permite que a molécula aproxime-se da superfície do eletrodo a

tempo de reagir e o resultado é uma “queda” de corrente de oxidação, podendo chegar até mesmo a um decaimento da corrente em velocidades extremas.

Desta forma, a fim de ter uma melhor sensibilidade o valor de frequência selecionada foi 80 s^{-1} , já que acima deste valor problemas cinéticos como: perda de sinal voltamétrico e deformação dos voltamogramas foram observados.

4.1.4.2 Amplitude de pulso

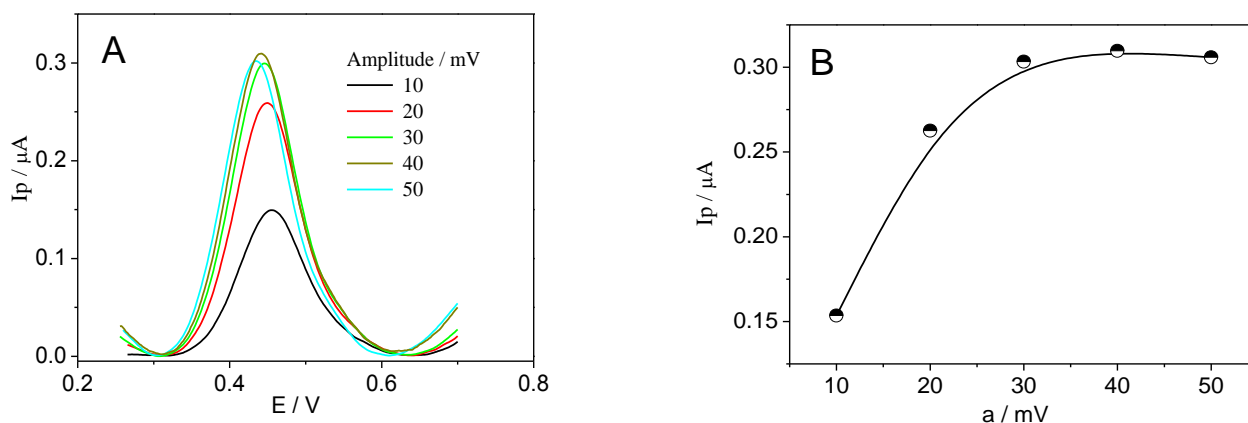
A amplitude de pulso é um parâmetro voltamétrico de fundamental importância quando se estuda metodologias eletroanalíticas. Este tem uma relevante influência na largura do voltamograma, ou seja, está relacionado diretamente com uma boa seletividade da medida voltamétrica. De acordo com Lovric⁴², altos valores de amplitude podem promover um alargamento do voltamograma, o que leva a uma perda de seletividade da medida devido à possibilidade de compostos indesejados, presentes na amostra, sofrerem processo redox próximo à faixa de potencial do composto analisado.

Desta forma, a amplitude de pulso foi avaliada na faixa de 10 a 50 mV para a oxidação do DES. Para tanto, a frequência e o incremento de varredura foram mantidos constantes, 80 s^{-1} e 2 mV, respectivamente.

Observando a Figura 24A e 24B pode-se notar que houve um aumento considerável da corrente de pico dos voltamogramas com o aumento da amplitude no intervalo de 10 a 30 mV, entretanto, para valores de amplitude superiores a 30 mV o que se observa é uma perda de corrente, mantendo-se praticamente constante até 50 mV. Também se observou um alargamento do voltamograma, que se estabilizou a partir de 30 mV. Não foi observado deslocamento do potencial de pico com a amplitude, o que sugere um processo quase reversível.⁴²

Os resultados obtidos levaram a escolha da amplitude de 30 mV como valor ótimo para oxidação do DES, sendo selecionado para o desenvolvimento do trabalho.

Figura 24 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), em diferentes amplitudes de pulso de potencial na faixa de 10 a 50 mV .(B): Relação entre a corrente de pico e a amplitude de pulso. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

4.1.4.3 Incremento de varredura

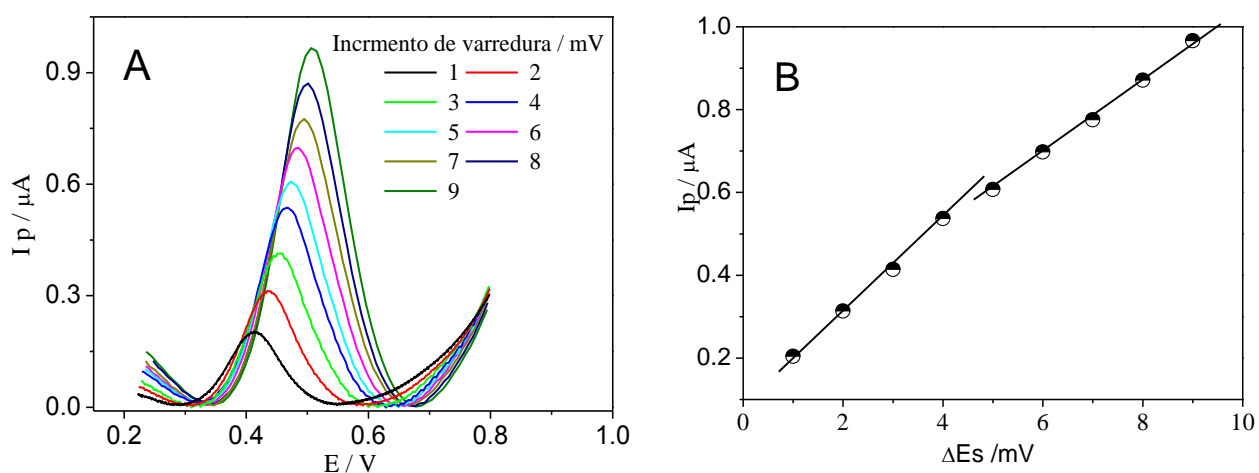
O incremento de varredura é o último parâmetro estudado e define, juntamente com a frequência de pulso, a velocidade de varredura de potencial da voltametria de onda quadrada.

O estudo deste parâmetro é importante por, geralmente, proporcionar um aumento de sinal voltamétrico, isto significa em termos analíticos maior sensibilidade à metodologia estudada. Entretanto, o analista precisa ser cuidadoso na escolha do valor de incremento, já que dependendo do sistema estudado altas velocidades de varredura podem proporcionar prejuízo na resolução do voltamograma, acarretando em perda de informação, principalmente, corrente máxima e até mesmo potencial de pico voltamétrico.

Neste trabalho foi feito um estudo do incremento de varredura para determinar o valor que mais se adequava ao sistema estudado. A Figura 25A mostra os voltamogramas referentes à variação do incremento de varredura, avaliado no intervalo de 2 a 10 mV para a oxidação do DES em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Os

parâmetros de frequência e amplitude utilizados foram 80 s^{-1} e 30 mV , anteriormente otimizados.

Figura 25 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação do DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes incrementos de varredura. (B): Relação entre a corrente de pico e o incremento de varredura. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

Foi possível observar um aumento da corrente de pico dos voltamogramas com o aumento do incremento aplicado. Porém, junto com este aumento houve um alargamento considerável do voltamograma, este fato é de certo modo desfavorável visto que uma das características importantes no voltamograma deve ser uma pequena largura de meia altura, ΔE na metade da corrente de pico voltamétrico. Segundo a literatura o ideal é que este valor não ultrapasse 100 mV .

A Figura 25B apresenta a correlação obtida entre a corrente de pico dos voltamogramas e o incremento de varredura aplicado. Uma tendência linear foi observada em toda a faixa de valores estudados, podendo-se chamar a atenção apenas para uma pequena mudança de inclinação da curva a partir de 4 mV . Esta diferença pode ser atribuída ao aumento de velocidade de varredura com o incremento aplicado ($v = f \Delta E_s$).

A partir do conjunto de experimentos onde foram variados o parâmetros da VOQ e aplicando-se os critérios adequados, pode-se definir como parâmetros ótimos de frequência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s) os valores de: 80 s^{-1} , 30 mV e 4 mV, respectivamente.

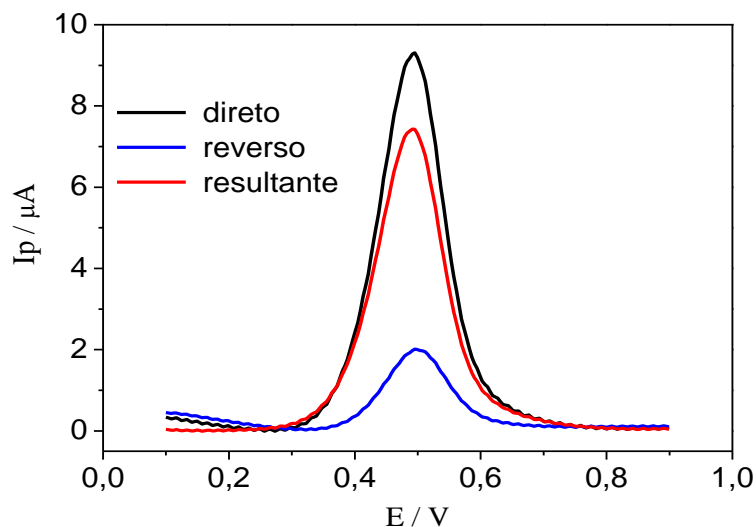
4.1.4.4 Estudo das componentes de corrente

A resposta voltamétrica na VOQ é composta pela diferença entre a componente direta e reversa das curvas, que dizem respeito aos processos de oxidação e redução, respectivamente, uma vez que na voltametria de onda quadrada os dois processos ocorrem quase simultaneamente, pois são aplicados potenciais de oxidação e redução em intervalos muito pequenos de tempo. Estas são obtidas de forma simultânea pela programação de aplicação de potencial e leitura de corrente. Desta forma, a resposta obtida é uma resultante, geralmente, com valores de corrente maiores que os da corrente direta ou reversa.

Este formato de medida propicia o diferencial na VOQ, maior sensibilidade e diminuição da corrente capacitiva. Além disso, podemos fazer uma análise a respeito da reversibilidade do processo estudado, onde são avaliados o sentido das componentes, a simetria e o deslocamento destas em termos de potencial de pico obtidos.

A Figura 26 mostra as componentes de corrente obtidas aplicando os parâmetros otimizados, $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, para a oxidação do DES $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Observou-se que nesse sistema tanto a componente direta, (varredura anódica) quanto a componente reversa (varredura catódica) têm sentido positivo, o que leva a uma resultante (componente direta menos reversa) de intensidade de corrente menor.

Figura 26 - Componentes de corrente para o DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

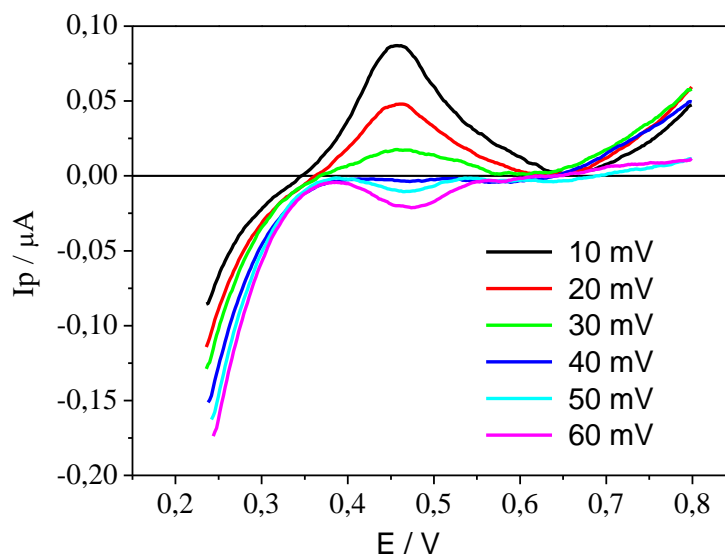
Uma possível explicação para este fato é, que apesar de se tratar de um processo quase reversível, como foi observado em outros parâmetros estudados, não é possível observar corrente de redução, ou seja, a inversão do pulso não proporciona energia suficiente para reduzir o composto nesta superfície, porém ainda tem energia para oxidar espécies que não foram oxidadas no pulso direto, sendo assim, o que se observa são componentes no mesmo sentido.

Um estudo mais detalhado das componentes foi feito e se observou que a amplitude de pulso tem uma influência direta no resultado obtido. A Figura 27 mostra o comportamento voltamétrico da oxidação do DES sobre carbono vítreo, em relação à componente reversa do estudo de variação da amplitude de pulso aplicado.

Observa-se que em amplitudes de pulso variando de 10 a 30 mV o pico da componente reversa tem um sentido de corrente positiva, mesmo sentido da corrente direta, mas decresce proporcionalmente ao aumento da amplitude aplicada. E a partir da amplitude de 40 mV o sentido da componente é negativo, como esperado para a corrente reversa.

O resultado mostra que para amplitudes mais baixas, o potencial aplicado não reduz a molécula de DES oxidada, mas em amplitudes a partir de 40 mV o salto de potencial gerado no pulso favorece a redução da molécula no pulso reverso.

Figura 27 - Comportamento voltamétrico da componente reversa no estudo da variação da amplitude de pulso de potencial para a oxidação do DES sobre carbono vítreo em meio de Tampão BR (pH 7).



Fonte: O próprio autor.

O resultado obtido mostrou que o mais adequado seria utilizar a componente direta como resposta analítica para o desenvolvimento da metodologia, visto que esta apresentou maior intensidade de sinal que o valor da componente resultante.

4.1.5 Determinação Eletroanalítica

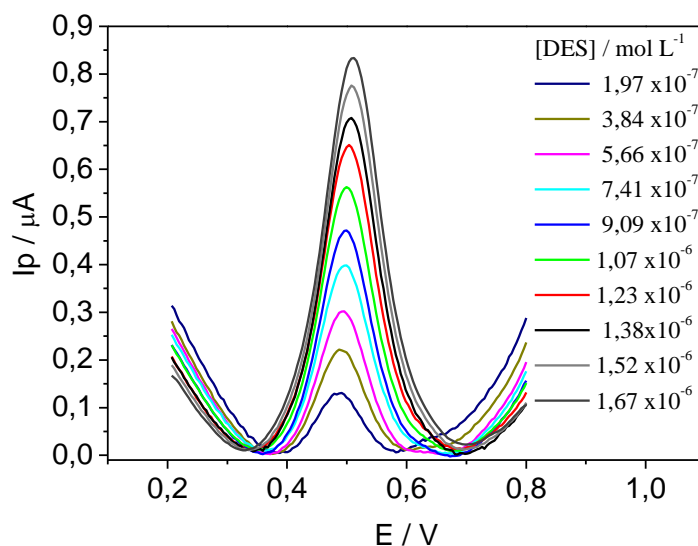
4.1.5.1 Construção das Curvas Analíticas

Após a caracterização voltamétrica e estudo dos parâmetros da voltametria de onda quadrada iniciou-se o desenvolvimento da metodologia para determinação de DES sobre a superfície de carbono vítreo. Para execução das medidas analíticas foi

utilizado tampão BR pH 7 e os parâmetros voltamétricos foram: $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

Utilizando uma célula eletroquímica padrão de três eletrodos foram feitas leituras com diferentes concentrações do analito, obtidas por sucessivas adições de $100 \mu\text{L}$ de uma solução estoque de DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a célula contendo 5 mL de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Foram feitas 10 adições e a faixa de concentração estudada foi de $1,96 \times 10^{-7}$ a $1,67 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 28 mostra os voltamogramas obtidos para cada adição de DES, na faixa de potencial de $0,2$ a $0,8 \text{ V}$.

Figura 28 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em concentrações variando de $1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,67 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

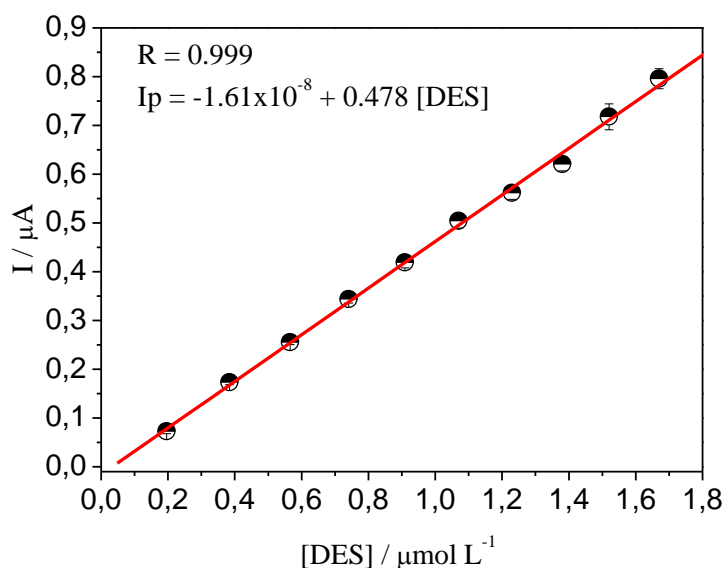


Fonte: O próprio autor.

Foi possível observar um crescimento na corrente de pico dos voltamogramas proporcional a concentração do analito. O potencial redox se manteve praticamente constante em todas as concentrações, mostrando que nessas condições não se teve um efeito significativo da adsorção dos produtos da oxidação do DES, como era de se esperar pela característica do analito.

A partir das correntes de pico dos voltamogramas obtidos em cada concentração, foram traçadas curvas analíticas que mostraram uma ótima correlação linear dos pontos em toda a faixa de concentração estudada, $R = 0,999$, como pode ser visto na Figura 29. É importante ressaltar que todas as medidas foram obtidas em quintuplicata. No gráfico apresentado cada ponto está representado pela média das cinco medidas realizadas e seu respectivo desvio padrão.

Figura 29 - Curva analítica para DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir dos valores médios ($n = 5$) das correntes de pico com concentração variando de $1,96 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,67 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com suas respectivas barras de desvio padrão, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: O próprio autor.

Outra característica importante é o coeficiente angular da curva de trabalho. Este parâmetro expressa a sensibilidade da metodologia analítica e ainda pode dar indícios de interferência quando comparamos com outras curvas obtidas. Na metodologia estudada foi obtido um coeficiente angular de 0,48, o que mostra uma boa sensibilidade para metodologias eletroanalíticas, visto que os valores de concentração e corrente apresentaram-se na mesma ordem de grandeza. A equação da reta para a

curva analítica, com os respectivos intervalos de confiança de 95%, para os valores dos coeficientes linear e angular são dadas por:

$$I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = -1,61 \times 10^{-8} + 0,48 \text{ [DES]} \quad (7)$$

Observando o coeficiente linear da curva analítica notou-se que este apresentou um valor negativo, o que pode ser interpretado como evidência de erro sistemático na metodologia, sendo assim, foi feito um teste t de significância para 95% de confiança, que pode descartar a presença deste tipo de erro.⁶¹

O teste t correlaciona o valor estatisticamente real com valor obtido experimentalmente dentro de um limite de confiança pré-estabelecido. Para o coeficiente linear da curva analítica o valor ideal seria zero, já que o sinal esperado quando a concentração do analito tende à zero seria uma corrente nula.

Porém, desvios positivos e negativos podem ser verificados e um valor aceitável para esta flutuação pode ser avaliado de acordo com valores tabelados para o teste t .⁶¹ O cálculo do valor de t foi obtido de acordo com a equação 8.

$$t = (\bar{X} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{S} \quad (8)$$

onde \bar{X} é a média dos valores de coeficiente linear obtidos, n o número de experimentos e S o desvio padrão para a média dos valores de coeficiente linear.

De acordo com este teste, o valor de t calculado foi de 1,27, sendo o valor de t tabelado de 2,78, mostrando não haver diferença significativa entre o valor do coeficiente linear e o valor zero, valor esperado. sendo assim, a hipótese de erro sistemático na metodologia apresentada pode ser descartada.

A partir das curvas analíticas construídas foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Para tanto, foi utilizado o desvio padrão do coeficiente linear das curvas analíticas, método diferente do recomendado pela IUPAC,

mas que permite obter valores mais próximos ao que a metodologia realmente permite quantificar e detectar.⁶¹

A Tabela 5 apresenta a equação da reta, o coeficiente de correlação (R) da curva analítica, o desvio padrão do coeficiente linear de cinco curvas (S_b), a inclinação da curva analítica (s), bem como o valor do limite de detecção (LD), do limite de quantificação (LQ), a repetibilidade e reprodutibilidade.

Tabela 5 - Resultados obtidos a partir das curvas analíticas para DES sobre superfície de carbono vítreo em tampão BR 0,04 mol L⁻¹. A varredura foi feita na faixa de potencial de 0,2 a 0,8 V. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

Parâmetro	Valor
Linearidade	$1,96 \times 10^{-7}$ a $1,67 \times 10^{-6}$
Equação da reta	$I_p = -1,61 \times 10^{-7} + 0,478[\text{DES}]$
R	0,999
S_e (A)	$8,91 \times 10^{-9}$
S (A/mol L ⁻¹)	0,478
LD (mol L ⁻¹)	$5,58 \times 10^{-8}$ (14,9 ppb)
LQ (mol L ⁻¹)	$1,89 \times 10^{-7}$ (49,9 ppb)
Repetibilidade (%)	1,65 (n = 10)
Reprodutibilidade (%)	3,47 (n = 5)

Fonte: O próprio autor.

Os valores de LD e LQ foram de $5,58 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (14,9 ppb) e $1,89 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (49,9 ppb), respectivamente. É interessante ressaltar que os valores obtidos foram da mesma ordem de grandeza que os obtidos por *Bin et al.*,²⁹ apesar deste utilizar o desvio padrão dos brancos, que permite obter valores de LD e LQ bem inferiores, porém, que não refletem a realidade quanto a capacidade do método desenvolvido. Os valores mostram um método que permite quantificar quantidades traço do analito, apesar das dificuldades esperadas devido à adsorção do produto da reação redox do DES à superfície do eletrodo, mostrando que a adsorção desta molécula no substrato é

fraca, não prejudicando sensivelmente o desenvolvimento da metodologia de determinação.

4.1.5.2 Avaliação da precisão da metodologia

Em métodos analíticos é de fundamental importância que se possa reproduzir a metodologia sem haver diferença significativa de resultados. Para avaliar se a metodologia proposta segue este requisito, foi feita uma avaliação de repetibilidade e reprodutibilidade das análises feitas.

Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada considerando-se 10 medidas sucessivas da amostra, em uma mesma solução de DES contendo $5,66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A Tabela 6 mostra os valores de corrente de pico obtidos para cada leitura feita. Feito isto, foram calculadas as médias e o desvio padrão dos resultados obtidos e a partir destes calculado o RSD de 1,65%, (n=10).

Tabela 6 - Estudos de repetibilidade das análises de DES $5,66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vitreo em eletrólito de suporte (Tampao BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

Replicatas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$I_p / 10^{-7} \text{ A}$	2,25	2,23	2,23	2,23	2,27	2,25	2,19	2,17	2,18	2,17

Fonte: O próprio autor.

Repetibilidade intermediária

A reprodutibilidade foi avaliada considerando-se 5 medidas de uma solução contendo $5,66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de DES. Essas medidas foram realizadas em soluções diferentes e em dias diferentes, sendo tomado o cuidado de reproduzir ao máximo a metodologia proposta. A Tabela 7 mostra os valores de corrente de pico obtidos para

cada leitura. De posse dos dados experimentais foi calculada a média e desvio padrão dos resultados e a partir destes foi calculado um RSD de 3,47% (n=5).

Tabela 7 - Estudos de reprodutibilidade das análises de DES $5,66 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ sobre carbono vítreo em eletrólito suporte (Tampão BR 0,04 mol L⁻¹). $f = 80$ s⁻¹, $a = 30$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV.

Replicatas	1	2	3	4	5
$I_p / 10^{-7}$ A	2,23	2,43	2,28	2,27	2,25

Fonte: O próprio autor.

A repetibilidade e repetibilidade intermediária foram avaliadas em termos de desvio padrão relativo (RSD). Os valores obtidos foram 1,64% e 3,47%, respectivamente, sendo os valores limite para estes parâmetros de 2% e 5%.⁶¹ O resultado mostra uma metodologia confiável em termos estatísticos, para análises de rotina deste composto.

4.1.5.3 Avaliação da exatidão da metodologia

O método de avaliação da exatidão foi o de adição e recuperação realizado por meio da construção de uma curva de recuperação, que neste caso consistiu em se fazer uma contaminação inicial do eletrólito puro, com padrão ou amostra comercial, e em seguida sucessivas adições de padrão. O estudo de recuperação do DES foi feito em eletrólito suporte, urina sintética e em água natural. As soluções foram preparadas como descrito na metodologia.

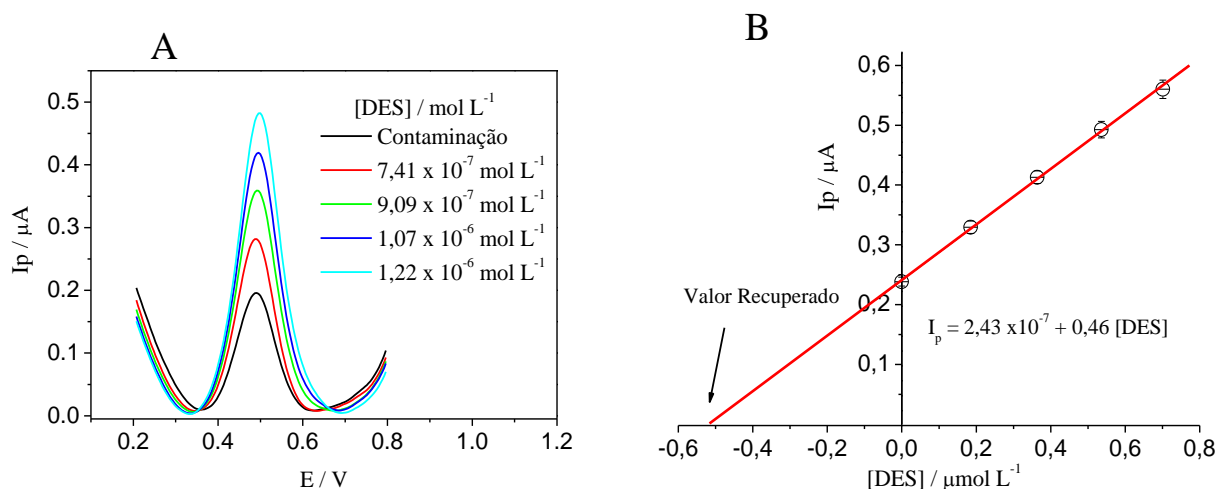
Em todas as determinações foram feitas dopagens da matriz com uma solução padrão de DES ou do fármaco. A concentração teórica das soluções problema foi de $5,66 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de DES, referente ao terceiro ponto da curva analítica. Em seguida, foram feitas sucessivas adições de alíquotas de 100 μ L de DES $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Após a contaminação e a cada adição de alíquota padrão a solução foi analisada por voltametria de onda quadrada.

Determinação em eletrólito de suporte

A Figura 30 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a correlação entre a corrente de pico das medidas voltamétricas e a concentração do analito em meio de eletrólito suporte.

Foi possível observar uma ótima correlação dos pontos medidos, com um $R = 0,999$, mostrando que na faixa estudada o método pode ser utilizado para quantificar este composto, uma vez que apresenta uma resposta linear da corrente com a concentração.

Figura 30 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 5$). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

As análises foram realizadas em quintuplicata para cada ponto e a partir dos resultados obtidos um tratamento estatístico adequado foi feito, na Figura 30B encontra-se o gráfico de corrente de pico versus concentração do padrão DES, os valores de corrente de pico no gráfico são uma média das cinco análises feitas para cada concentração, com seu respectivo desvio padrão. Os resultados tratados

estatisticamente mostraram uma recuperação média de $91,70\% \pm 2,08$ em eletrólito suporte.

O resultado mostra que apesar da adsorção do produto reacional sobre a superfície do eletrodo, o procedimento de limpeza por borbulhamento de gás permite uma boa limpeza da superfície permitindo o acesso ao analito mesmo após serem realizadas sucessivas medidas.

Determinação em formulação farmacêutica

As formulações farmacêuticas, além do princípio ativo de interesse fitoterápico possui uma gama de excipientes que, em sua maioria, não são eletroativos. Apesar disto, a aglomeração da pastilha do medicamento pode dificultar a dissolução deste em solução, e assim, promover um menor valor de recuperação.

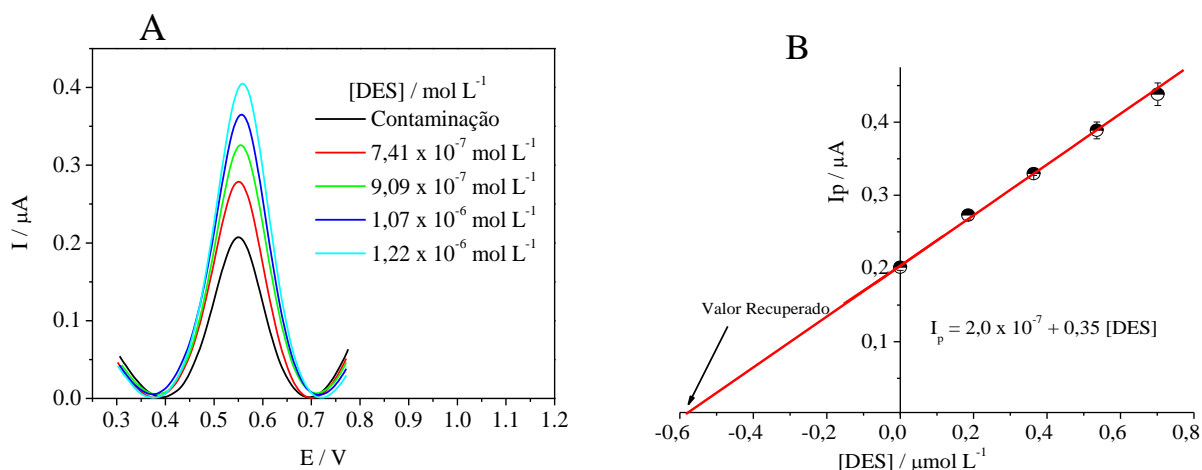
Na determinação do DES em formulação farmacêutica foi feita uma cuidadosa etapa de extração do princípio ativo, que constou da maceração dos comprimidos, dissolução prévia da massa adequada e agitação vigorosa em banho ultrassônico. Desta forma, buscou-se uma completa dissolução do princípio ativo, DES, do fármaco.

Utilizando está solução foi feita uma contaminação de uma alíquota de eletrólito e posterior adição de padrão de uma solução padrão DES $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 31 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a correlação entre a corrente de pico das medidas voltamétricas e a concentração de analito para a determinação do DES em formulação farmacêutica.

A presença de excipientes na amostra não revelou distorções nos voltamogramas de onda quadrada, sendo visualizado apenas um único pico referente à oxidação do DES, Figura 31A, portanto mostrando que não há interferentes na amostra comercial que possam responder eletroquimicamente na região de estudo do DES. A partir dos resultados voltamétricos foi grafada uma curva de recuperação que apresentou uma ótima correlação linear dos pontos, com um R de 0,999. Após o tratamento estatístico foi obtido um valor de recuperação de $94,32 \pm 0,79$. O baixo erro

estatístico associado ao percentual de recuperação mais uma vez confirma a boa repetibilidade das medidas eletródicas.

Figura 31 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em formulação farmacêutica. B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 5$). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

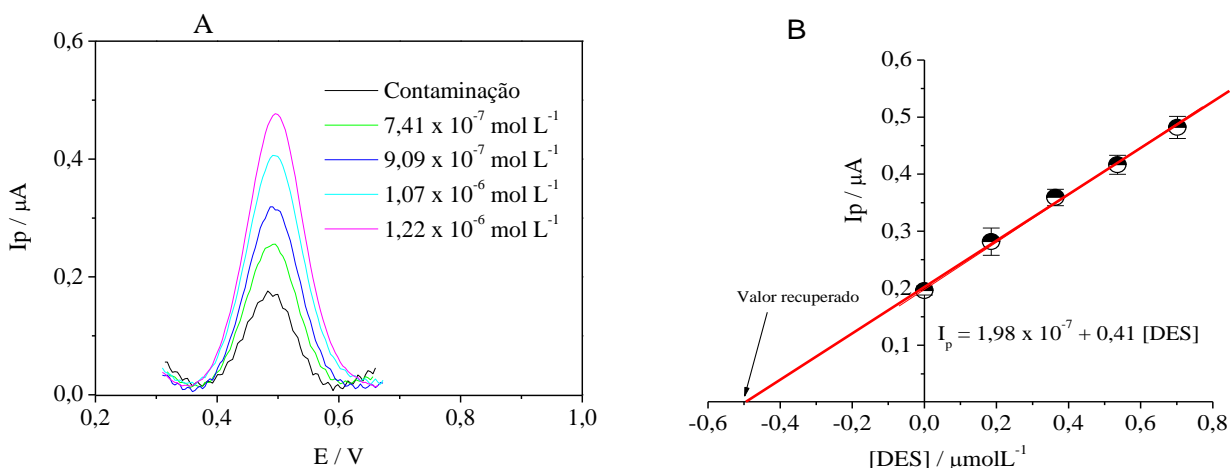
Determinação em urina sintética

Uma solução de urina sintética foi preparada e utilizada para avaliar a recuperação do DES em uma matriz real. A importância desta determinação está no fato de que 50% a 90% da dosagem ingerida de um fármaco ser expelida pelo corpo humano sem sofrer modificação.⁷ Sendo assim, uma boa metodologia analítica precisa ser capaz de detectar a presença de fármacos em urina.

Voltamogramas de onda quadrada e a respectiva curva de recuperação em urina sintética foram obtidos, Figura 32. Mais uma vez não pode ser observada qualquer alteração mais significativa nos voltamogramas de onda quadrada, Figura 32A. A curva de recuperação apresentou boa relação linear como um R de 0,998 e baixo valor de dispersão para cada ponto, indicando uma boa reprodutibilidade das

medidas. Por fim, o valor calculado para a recuperação do fármaco em urina sintética a partir desta curva foi de $89,00\% \pm 3,99$.

Figura 32 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de urina sintética. B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 5$). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

Para a curva de recuperação do padrão de DES, Figura 30, obtida a partir dos valores de corrente das análises realizadas em eletrólito suporte, o coeficiente angular foi de 0,46, enquanto para a curva de recuperação obtida a partir das análises de DES realizadas em urina sintética o coeficiente angular foi de 0,41. Os valores de inclinação da reta estão muito próximos mostrando que não há uma influência da matriz desta amostra na detecção do composto.

Determinação em água natural

Dos bens naturais mais preciosos para a vida, a água se destaca por ser essencial e se tornar mais escassa a cada dia. Um dos motivos para isto seria a poluição das grandes cidades, principalmente, os poluentes industriais que apenas nos últimos anos se tornaram um alvo de pesquisa. Dentre estes, os fármacos são uma

grave ameaça aos efluentes, pois mesmo em níveis traço fornecem alto risco à vida e ao ambiente.

Metodologias capazes de detectar baixas concentrações destes poluentes são raras e de alto custo, e a eletroanalítica pode ser uma alternativa viável.

Este tópico apresenta a determinação do DES em água natural. Uma amostra de água proveniente do açude de Baturité foi utilizada como objeto de estudo. Desta forma, a robustez do método pode ser avaliada frente à complexidade da matriz.

A Figura 33 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e respectiva curva de recuperação em água natural.

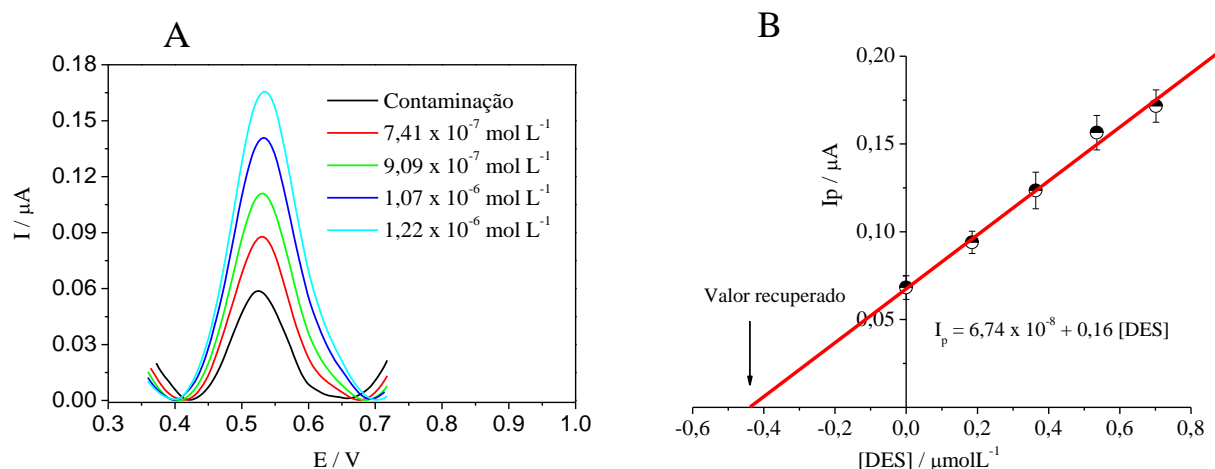
Analisando os voltamogramas, Figura 33A, não se observa alteração em seu perfil, entretanto, a curva de recuperação obtida a partir das correntes de pico voltamétrico apresentaram valores abaixo dos obtidos nos outros eletrólitos estudados, como pode ser visto na Figura 33B, com uma inclinação em torno de 3 vezes menor.

Uma amostra de água natural apresenta uma complexa matriz que pode interferir na resposta eletroquímica. Sendo assim, uma redução das correntes de pico possivelmente está associada à matéria orgânica e o alto nível e variedade de íons em solução que podem se adsorver à superfície eletródica diminuindo o sinal do analito.

Apesar deste problema observou-se uma boa proporcionalidade entre a corrente de pico e a concentração, obtendo-se um R de 0,997, dentro do especificado pela ANVISA.⁶²

A partir da curva de recuperação foi calculada uma recuperação média de 77,85% \pm 5,74. Este valor levando em consideração a variação, está dentro do especificado para determinações traço.⁶² Os resultados obtidos mostraram que a metodologia apresenta níveis de recuperação dentro dos apresentados por outros métodos apresentados na literatura.^{18,23}

Figura 33 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de DES sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. B) Curva de recuperação para o DES sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 5$). $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

Os resultados obtidos em todas as matrizes estudadas estão apresentados na Tabela 8 para fins comparativos. As recuperações em eletrólito e formulação farmacêutica apresentaram os maiores valores recuperados e menores variações, mostrando que nestes meios houve uma melhor reprodutibilidade das medidas. Já em urina sintética e água de natural, devido a uma maior complexidade das matrizes, houve uma redução nos valores recuperados, além de uma maior “flutuação” dos resultados.

Tabela 8 - Resultados obtidos para curvas de recuperação do DES sobre superfície de carbono vítreo em eletrólito de suporte, formulação comercial e águas de rio. $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

Recuperação	[DES] _{adíc.} (mol L^{-1})	[DES] _{recup.} (mol L^{-1})	% Rec.
Eletrólito	$5,66 \times 10^{-7}$	$5,19 \times 10^{-7}$	91,70% \pm 2,08
Formulação farmacêutica		$5,34 \times 10^{-7}$	94,32% \pm 0,79
Urina sintética		$5,04 \times 10^{-7}$	89,00% \pm 3,99
Água natural		$4,41 \times 10^{-7}$	77,85% \pm 5,74

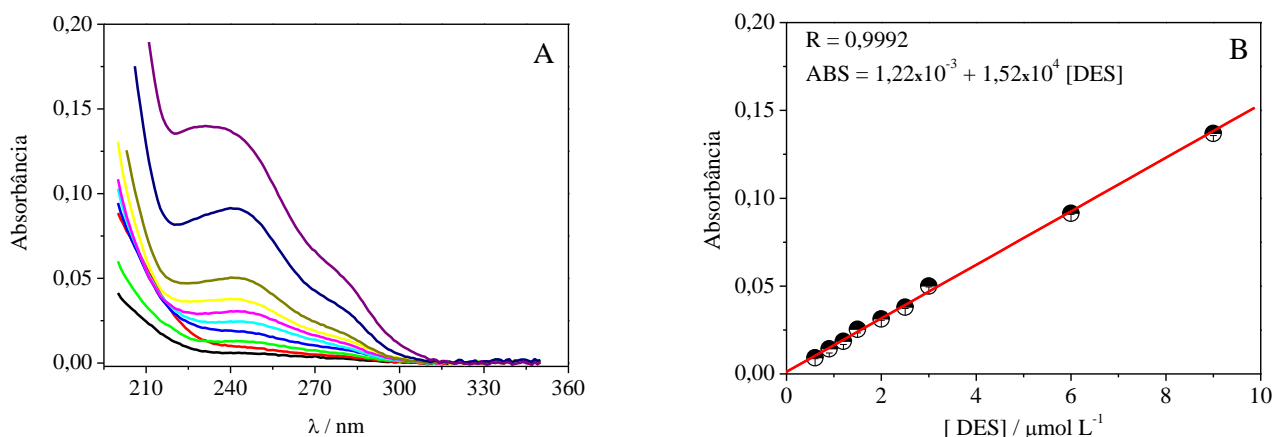
Fonte: O próprio autor.

4.1.5.4 Comparação com a técnica de UV-vis

Para fins de comparação dos resultados obtidos por eletroquímica, foi feito um estudo de determinação do DES utilizando a técnica de UV-Vis, técnica padrão recomendado pela Farmacopéia Britânica²⁶. Assim como nas medidas voltamétricas as análises espectroscópicas foram feitas eletrólito suporte (tampão BR pH 7,0) e água natural.

Inicialmente, foram feitas varreduras de comprimento de onda na faixa de 200 a 450 nm, utilizando como amostra soluções de concentração conhecida de DES na faixa de $3,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A Figura 34A mostra os espectros de absorção obtidos para cada amostra de DES utilizada. Observou-se que o espectro de absorção do DES apresenta dois sinais, sendo, um mais intenso, com intensidade máxima em um comprimento de onda de 240 nm, e o segundo de menor intensidade, com intensidade máxima em aproximadamente 285 nm. Para fins analíticos foi utilizado o sinal de absorção obtido em 240 nm.

Figura 34 - A) Espectros de UV-Vis para o padrão de DES em meio aquoso no intervalo de concentração de: $3,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. B) Curva analítica do DES obtida a partir dos experimentos de UV-Vis.



Fonte: O proprio autor.

A partir dos espectros obtidos, para a análise das amostras de DES foram construídas curvas analíticas a partir da intensidade máxima de absorção no comprimento de onda de 240 nm para cada concentração estudada. Os respectivos espectros e curva analítica são exibidos na Figura 34. O resultado segue expresso pela média e barras de erro dos respectivos pontos de concentrações analisadas.

A curva obtida apresentou-se linear em toda a faixa de concentração estudada, de acordo com a lei de Beer.⁶³ Por fim, foi feito um tratamento estatístico semelhante ao aplicado para a metodologia eletroquímica e obtidos os parâmetros analíticos expressos na Tabela 9.

Analisando os parâmetros de validação calculados pode-se notar que os valores de LD e LQ apresentados para as medidas por UV-Vis mostraram-se em uma ordem de grandeza cerca de mais de 10 vezes maior que os valores obtidos pela metodologia eletroquímica, sendo esta uma vantagem da técnica eletroquímica em relação a técnica recomendada pela Farmacopéia Britânica para determinação deste fármaco.

Tabela 9 - Resultados obtidos a partir das curvas de UV-Vis para o DES em tampão BR.

Parâmetro	Valor
Linearidade	$3,0 \times 10^{-7}$ a $9,0 \times 10^{-6}$
Equação da reta	$ABS = 1,22 \times 10^{-3} + 1,52 \times 10^4 [DES]$
R	0,999
S_e (A)	$2,98 \times 10^{-3}$
S (A/mol L⁻¹)	$1,52 \times 10^4$
LD (mol L⁻¹)	$5,88 \times 10^{-7}$
LQ (mol L⁻¹)	$1,96 \times 10^{-6}$
Repetibilidade (%)	1,41
Repetibilidade intermediária (%)	2,57

Fonte: O próprio autor.

Após a determinação das figuras de mérito foi avaliada, também, a exatidão do método por meio da adição de padrão para a recuperação do DES em eletrólito suporte, formulação farmacêutica e amostra de água natural. A Tabela 10 mostra os valores de recuperação obtidos por UV-Vis e seus respectivos percentuais de recuperação.

Os resultados em eletrólito apresentaram valores de 93,44 e 89,63 %, para a recuperação do padrão DES em eletrólito e formulação comercial, respectivamente. Estes valores estão muito próximos aos apresentados para a metodologia eletroquímica. Já para a recuperação de DES em amostra de água natural foi observado um percentual superior a 100%, o que pode indicar interferência de outra espécie da matriz estudada, que está absorvendo na mesma faixa do analíto. Na análise voltamétrica o mesmo não ocorreu, mostrando que a técnica eletroquímica é mais seletiva que a espectroscópica para a determinação deste fármaco. Além disso, o erro estatístico também se apresentou alto. Esse resultado mostra a viabilidade do método eletroquímico em relação ao método espectroscópico, visto que mesmo sem utilizar nenhuma metodologia de extração de amostra ou tratamento complexo de pré-tratamento foi possível se obter bons resultados de recuperação do analito investigado.

Tabela 10 - Resultados obtidos para curvas de recuperação do DES utilizando a técnica de UV-Vis.

Recuperação	[DES] _{adjc.} (mol L ⁻¹)	[DES] _{recup.} (mol L ⁻¹)	% Recuperação
Eletrólito	9,00 x 10 ⁻⁷	8,41 x 10 ⁻⁷	93,44% ± 2,26
Formulação comercial		8,06 x 10 ⁻⁷	89,63% ± 0,084
Água natural		1,05 x 10 ⁻⁶	116,7 % ± 6,81

Fonte: O próprio autor.

4.2 Metildopa

4.2.1. Caracterização eletroquímica

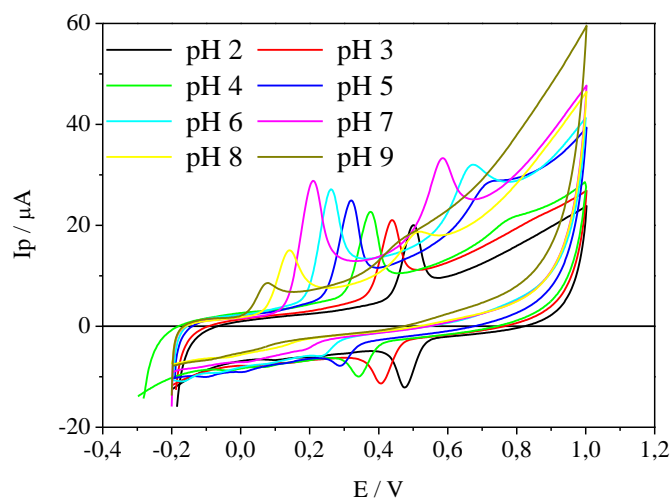
4.2.1.1. Estudo de pH

A metildopa apresenta em sua estrutura um grupo catecol representado por um anel aromático e duas hidroxilas conjugadas. Estas hidroxilas, em meio aquoso, se comportam como ácidos liberando um hidrogênio, e a extensão da desprotonação da molécula depende do pH do meio eletrolítico.

Para verificar a influência que a concentração hidrogeniônica tem sobre o processo redox da metildopa foi feito um estudo do pH do meio. Para tanto, foi utilizado o tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs, variando de 2 a 12, para este estudo foi empregada a técnica de voltametria cíclica.

A Figura 35 apresenta os voltamogramas cíclicos para a oxirredução da MDP $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes pHs. A superfície utilizada foi o carbono vítreo em uma faixa de potencial de $-0,3$ a $1,0 \text{ V}$.

Figura 35 - Voltamogramas cíclicos referente à oxirredução da metildopa em meio de Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pHs 2 a 9) sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

Observou-se a presença de um par redox nos voltamogramas obtidos nos diferentes valores de pH, diferindo no valor de potencial em cada pH. Em pH 2 o processo foi registrado em aproximadamente 0,5 V. Possivelmente, este processo redox está associado à oxiredução do grupo catecol da molécula de MDP. Além deste, foi registrado também um processo independente em potenciais mais positivos em pHs maiores que 3.

O aumento do pH do meio deslocou o E_p , referente ao par redox, para valores mais negativos, indicando um aumento da nucleofilicidade da molécula de MDP.^{64,65} Além disto, houve uma diminuição da reversibilidade do processo redox da molécula com o aumento de pH, possivelmente, devido à formação de uma nova espécie em altos potenciais, que desfavoreceu a redução da espécie formada na primeira oxidação, diminuindo assim sua corrente de pico de redução.

A partir dos voltamogramas cíclicos da MDP obtidos no estudo anterior foi feito um estudo da relação entre o pH do meio e os parâmetros de potencial e corrente de pico.

A Figura 36 apresenta a relação entre o pH e o potencial de pico (E_p) de oxidação e redução para a metildopa. Foi possível observar uma relação linear ($R = 0,999$) entre E_p e pH do meio para toda a faixa de pH estudada. O coeficiente angular das curvas obtidas mostraram um valor de $-0,058 \text{ V / pH}$, este valor dá indícios de que a reação ocorre com uma transferência de elétrons seguida por desprotonação.⁶⁶ As relações lineares estão representadas pelas equações 9 e 10.

$$E_{pico}(V) = 0,61 - 0,058 \text{ pH} \quad (9)$$

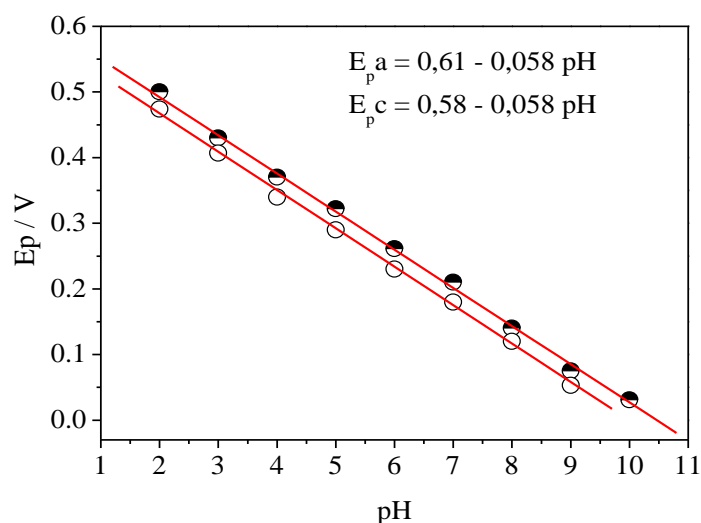
$$E_{pico}(V) = 0,58 - 0,058 \text{ pH} \quad (10)$$

Utilizando o valor da inclinação da reta de E_p vs. pH (equações 9 e 10) foi possível calcular o número de prótons envolvidos na reação utilizando a Equação 6, já apresentada no sub tópico 4.1.1.2 deste trabalho.

O valor da inclinação de $0,058 \text{ V / pH}$, utilizado na equação citada, mostrou uma relação entre o número de prótons e elétrons que participam da reação de

aproximadamente 1. Este valor permite concluir que o mecanismo redox do MDP depende de uma etapa de desprotonação da molécula.⁴⁸

Figura 36 - Relação entre o potencial de pico versus o pH para a oxidação do MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo.

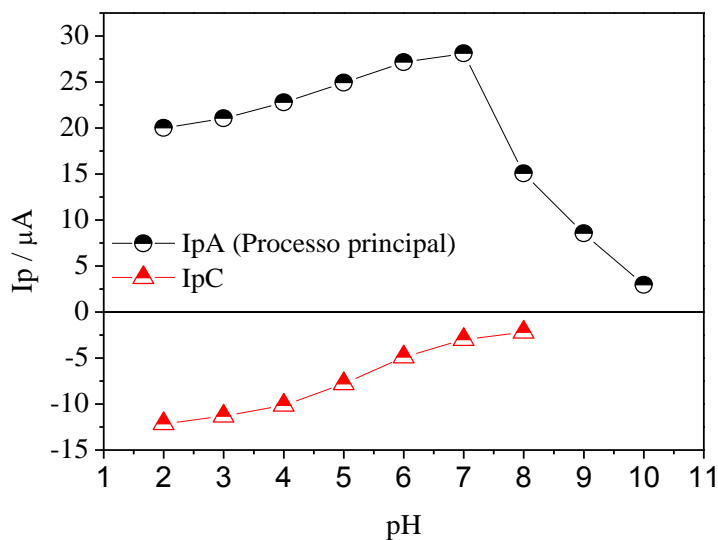


Fonte: O próprio autor.

A fim de definir a melhor condição de pH para a determinação eletroanalítica da MDP, um estudo da relação entre o pH do meio e a corrente de pico voltamétrico da MDP foi feito e está apresentado na Figura 37.

Observou-se um aumento da corrente de oxidação da MDP com o aumento de pH até o valor 7. Neste mesmo intervalo a corrente de redução da molécula reduziu proporcionalmente à corrente de oxidação, mostrando uma relação ente o pH e a reversibilidade do processo estudado. Além disto, com o aumento do pH há o favorecimento da oxidação do produto principal que se mostrou mais adsorvido e irreversível.

Figura 37 - Relação entre a corrente de pico contra o pH para a oxidação do MDP $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: o próprio autor.

Apesar de apresentar o melhor valor de corrente de pico em pH 7, a adsorção das espécies geradas não proporcionou uma boa repetibilidade das medidas, o que para fins analíticos é muito prejudicial. Então, mesmo perdendo um pouco de sensibilidade optou-se pelo valor de pH 2, onde obteve-se uma melhor repetibilidade nas medidas.

4.2.2. Caracterização voltamétrica

4.2.2.1 Estudo do potencial de inversão e estabilidade voltamétrica

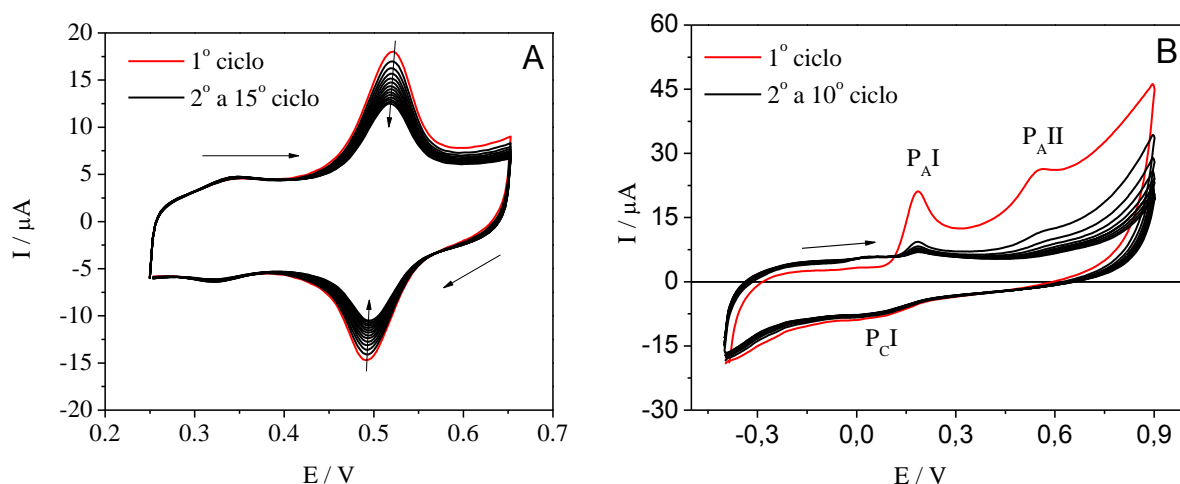
O estudo de pH feito anteriormente mostrou um deslocamento de potencial de pico para valores mais negativos com o aumento do pH, seguido de um aumento da corrente de pico anódico. Entretanto, em pH superior a 4 observou-se um segundo processo de oxidação em potenciais mais positivos, que se mostrou adsortivo e de difícil remoção da superfície eletródica.

Um estudo comparativo da estabilidade dos processos apresentados em pH 2 e 7 foi feito afim de caracterizar a estabilidade do processo redox e, assim, fornecer

critérios para a seleção de pH do meio mais adequado ao estudo eletroanalítico da MDP.

A Figura 38 apresenta o estudo da estabilidade voltamétrica quando registrados 15 ciclos voltamétricos consecutivos em uma solução de MDP $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O estudo foi feito a uma velocidade de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ em superfície de carbono vítreo.

Figura 38 - Voltamogramas cíclicos para 15 ciclos consecutivos de oxiredução do MDP $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2 (A) e 7 (B) sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

A Figura 38A apresenta os voltamogramas cíclicos em pH 2. O primeiro ciclo voltamétrico neste pH apresentou o maior valor de corrente, como esperado, sendo seguido de uma diminuição gradativa deste valor que se estabilizou no décimo ciclo.

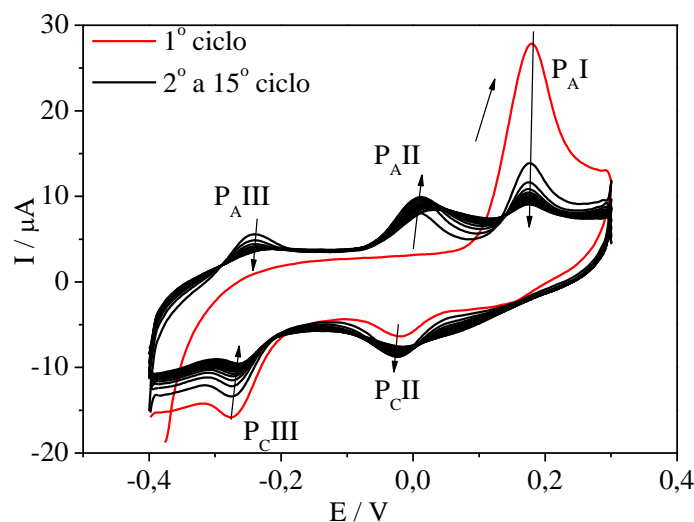
A redução da corrente de pico mostra a adsorção do produto reacional da MDP sobre a superfície de carbono. Esta adsorção reduz a área ativa do eletrodo e na mesma proporção a corrente do processo, entretanto, esta adsorção não se mostrou efetiva o suficiente para passivar completamente a superfície eletródica.

Já o resultado obtido em pH 7, apresentado na Figura 38B, mostra que a adsorção foi bem mais forte, reduzindo a corrente de pico a cerca de 30% do seu valor no primeiro ciclo, considerando o processo principal, pico anódico 1 ($P_{A I}$) em 0,18 V. Este fato deve estar relacionado ao segundo processo de oxidação gerado em 0,55 V,

proveniente da oxidação completa da MDP à sua respectiva quinona. Neste caso, a quinona adsorve fortemente à superfície eletródica passivando-a, o que causa a redução drástica da corrente do processo, afetando mais expressivamente a redução do composto.⁶⁷

Ainda em pH 7 foram feitos experimentos em uma janela de potencial reduzida, -0,4 a 0,3 V, Figura 39, região onde não é possível evidenciar o segundo processo anódico discutido anteriormente. O experimento foi feito também na velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ e concentração de $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 39 - Voltamogramas cíclicos para 15 ciclos consecutivos de oxiredução do MDP $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo.



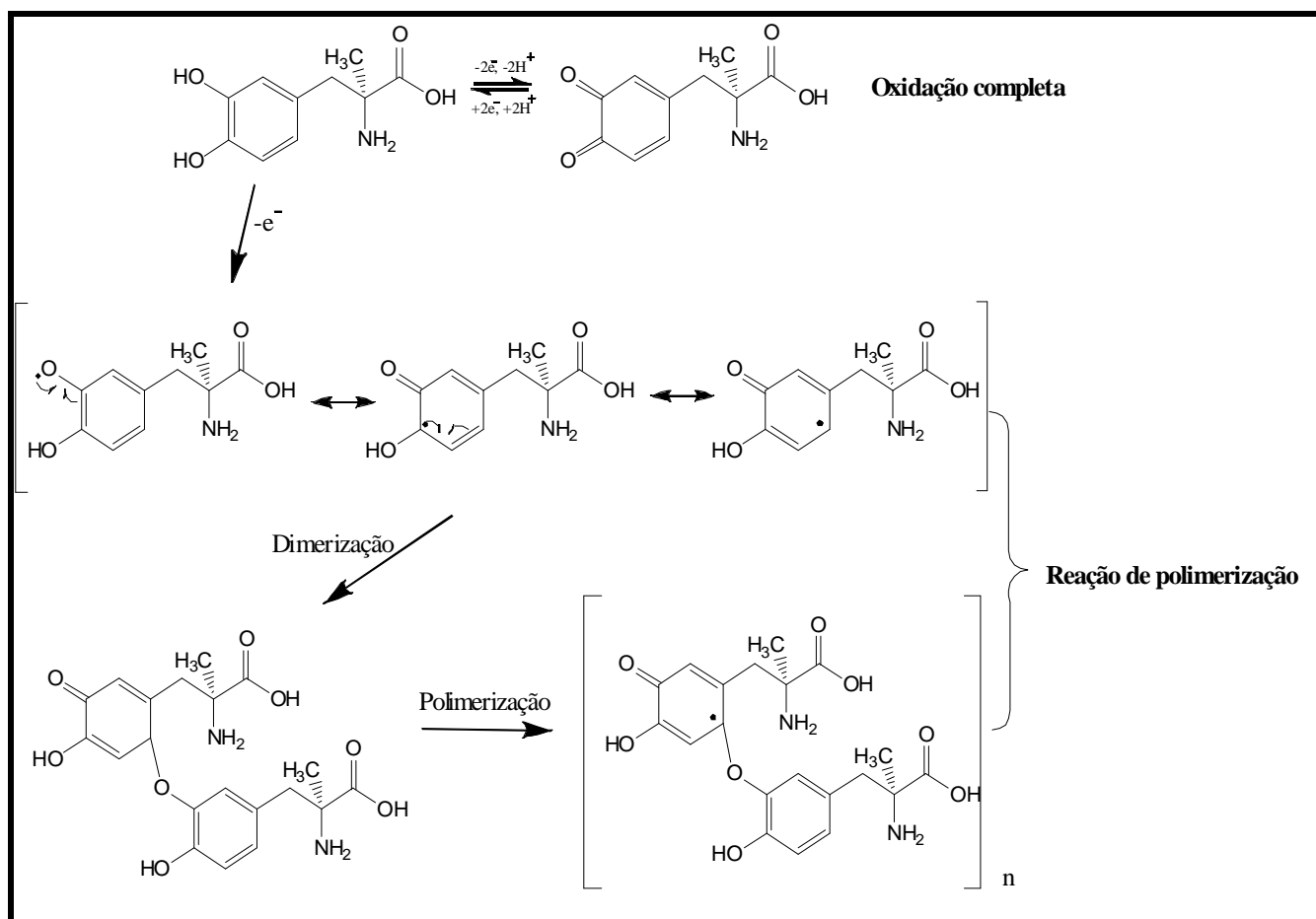
Fonte: O próprio autor.

Com a diminuição da faixa de potencial do experimento observou-se o aparecimento de outros processos redox à medida que os ciclos voltamétricos evoluíram. No primeiro ciclo (linha em vermelho) apenas um processo anódico em 0,18 V ($P_{A I}$) foi evidenciado. No sentido catódico foi possível observar dois processos, um em -0,02 V ($P_{C II}$) e outro em -0,27 V ($P_{C III}$). A partir do segundo ciclo, surgiram os processos anódicos, $P_{A III}$ e $P_{A II}$ em -0,24 V e 0,01V, respectivamente.

O par redox P_{AI}-P_{CI} apresentou um aumento da corrente com o aumento do número de ciclos se estabilizando no décimo ciclo. Este comportamento é característico de reação de eletropolimerização da molécula sobre a superfície eletródica onde o polímero formado é condutor.⁵⁴

O Figura 40 apresenta uma proposta mecanística para a oxirredução da metildopa sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR pH 7. A proposta é baseada nos voltamogramas cíclicos da MDP neste valor de pH.

Figura - 40 Proposta de mecanismo redox para a MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR (pH 7).



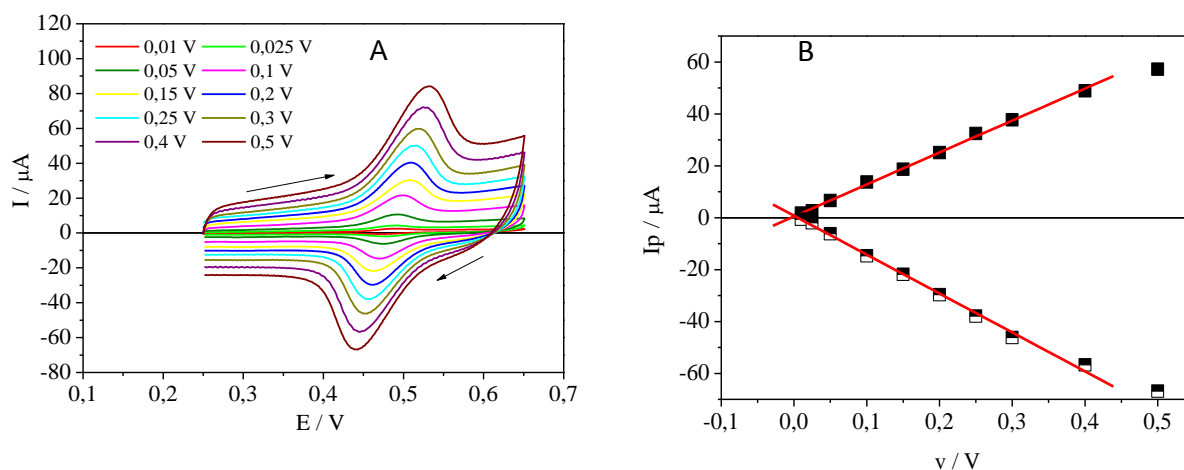
Fonte: O próprio autor.

4.2.2.2 Estudo da velocidade de varredura e avaliação de critérios de diagnósticos

Em virtude da forte adsorção e mudança de mecanismo observada quando se utilizou o pH 7 no estudo da metildopa, foi selecionado para um estudo analítico o pH 2. Neste pH se observou uma adsorção mais fraca sobre a superfície eletródica, sendo mais facilmente removida. Sendo assim, os estudos de velocidade de varredura e a aplicação dos critérios de diagnóstico visam caracterizar melhor o processo redox da MDP nesta condição.

Um estudo de velocidade de varredura foi feito para avaliar parâmetros relacionados à cinética e controle reacional no processo redox do DES sobre carbono vítreo. A Figura 41A apresenta os voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura para a oxidação da MDP em meio de tampão BR (pH 2) sobre a superfície de carbono vítreo. O estudo foi feito na faixa de potencial de 0,25 a 0,65 V, utilizando uma solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MDP, e a variação da velocidade de varredura se deu no intervalo de 0,01 a $0,5 \text{ Vs}^{-1}$.

Figura 41 - (A) Voltamogramas cíclicos referentes à variação da velocidade de varredura de 10 a 500 mV s^{-1} para a oxidação do MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) sobre superfície de carbono vítreo. (B) Relação entre a corrente de pico e a velocidade de varredura para o MDP em meio de tampão BR pH7.



Fonte o próprio autor.

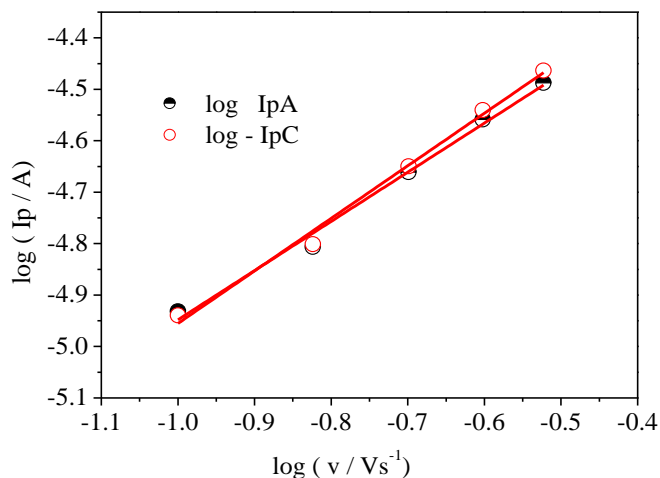
Os voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades varredura apresentaram um perfil aproximadamente simétrico, com deslocamento de potencial redox que aumentou com a velocidade, fenômeno característico de um processo quase reversível.⁶⁸

A partir das correntes de pico em cada velocidade estudada foi grafada a relação entre a corrente de pico (I_p) e a velocidade de varredura, observando-se um comportamento linear nas curvas obtidas, sugerindo que o processo redox é controlado por adsorção.^{48,56}

Adicionalmente, a partir dos dados obtidos no estudo de velocidade foi grafada a relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura apresentado na Figura 42. Este parâmetro fornece um dado quantitativo em relação ao controle reacional do processo, como foi explicado no subtópico 4.1.2.2.

A curva apresentou uma correlação linear ($R = 0,998$) e um valor de inclinação de aproximadamente de 0,95 e 1,02 para as relações anódica e catódica, respectivamente, o que confirma a influência da adsorção no processo de oxirredução da MDP.⁵⁶

Figura 42 - Relação entre o logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura, para o DES em tampão BR pH 7, sobre superfície de carbono vítreo.

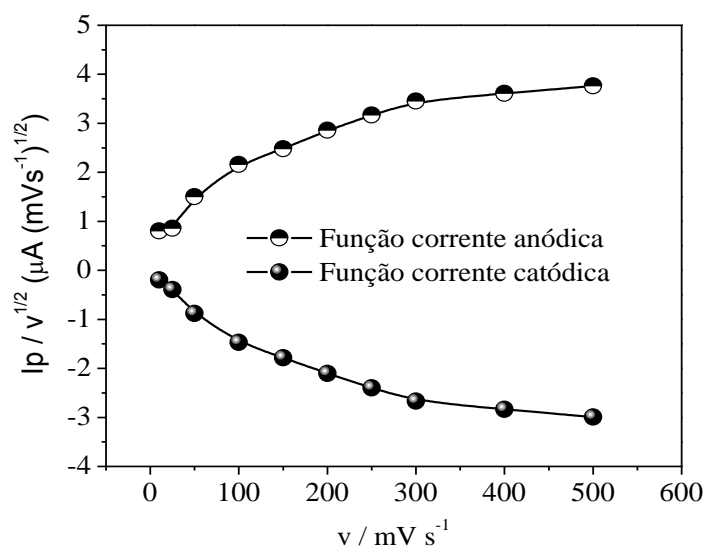


Fonte: O próprio autor.

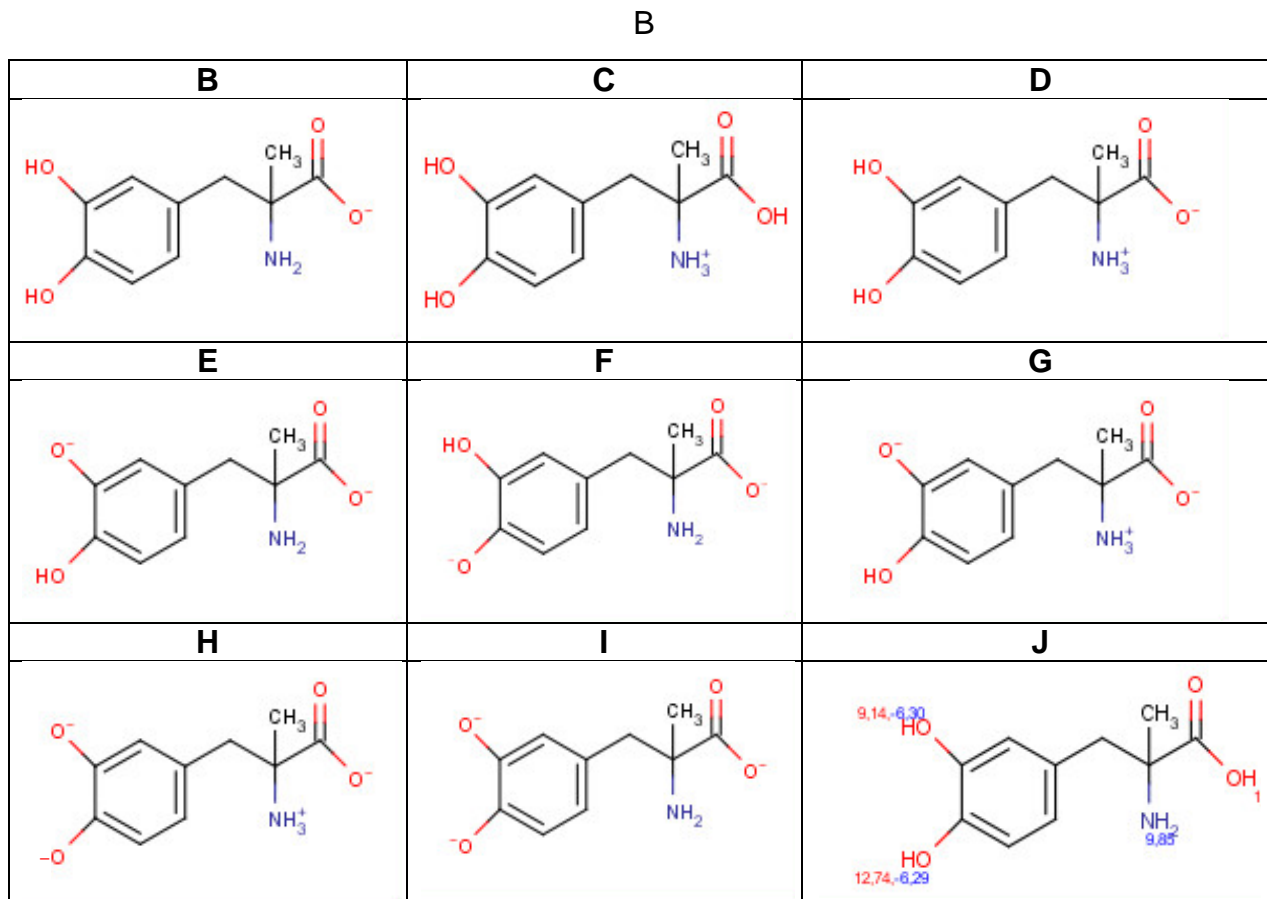
Por último, ainda utilizando os dados de velocidade de varredura, foram avaliados os critérios de Nicholson-Shain para caracterizar o tipo de mecanismo presente no processo redox estudado. O perfil da curva de função corrente ($I_p / v^{1/2}$) versus a velocidade de varredura (v) permite que se faça um diagnóstico comparativo de casos, previstos por Nicholson-Shain.⁵⁷

A Figura 43 apresenta o perfil da função corrente versus velocidade de varredura para a MDP sobre superfície de carbono vítreo. O gráfico apresentou um perfil simétrico em parábola para os parâmetros anódicos e catódicos. Relacionando o perfil do gráfico experimental com os critérios estabelecidos na literatura, observou-se que o mecanismo descrito no caso VII dos critérios de Nicholson-Shain é o que melhor descreve o processo de oxirredução da MDP, um processo catalítico com transferência reversível de carga.⁵⁷

Figura 43 - Correlação entre a função corrente ($I_p/v^{1/2}$) e a velocidade de varredura (v) para a oxirredução da MDP sobre superfície de carbono vítreo.



Fonte: O próprio autor.

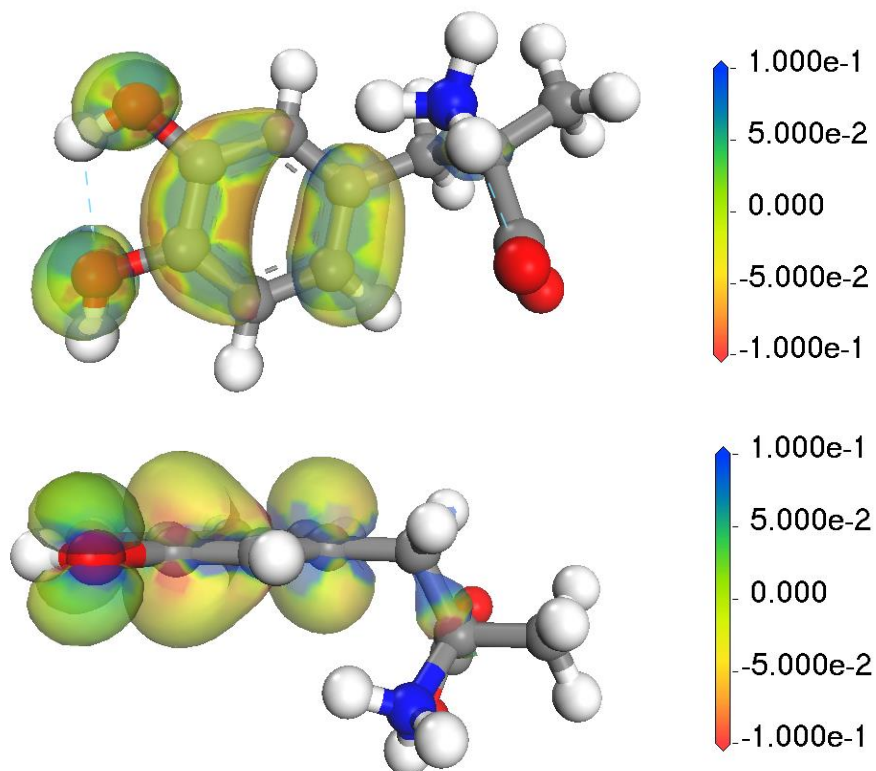


Fonte: O próprio autor

A Figura 45 apresenta a distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO na molécula de MDP. Observando a distribuição de cores e a escala representativa de energia pode-se ver que os sítios com maior volume de densidade eletrônica estão sobre os oxigênios e sobre o anel aromático, sendo estes os prováveis pontos de oxidação.

A densidade de carga sobre o anel aromático relativamente alta, em um primeiro momento, pode dar indícios de um possível sítio anódico, porém, a estabilidade proporcionada pela aromaticidade inviabiliza a oxidação do anel. Entretanto, a probabilidade de oxidação dos oxigênios fenólicos pode ser explicada por apresentar a formação de um intermediário com maior número de hiperconjugações,⁶⁹ gerando uma maior número de estruturas de ressonância, sendo então mais estável.⁷⁰

Figura 45 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de MDP em duas perspectivas .



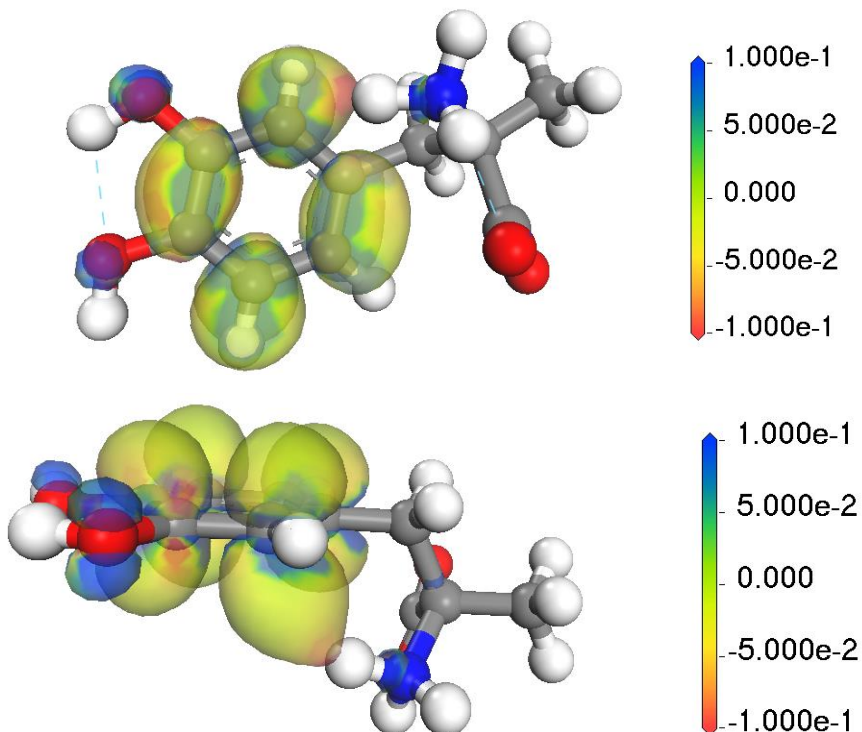
Fonte: O próprio autor.

O orbital LUMO caracteriza os possíveis sítios de redução da molécula, sendo assim, um cálculo da densidade eletrônica do orbital LUMO foi feita e está apresentada na Figura 46.

Como pode ser observado na Figura 46 uma maior densidade eletrônica se concentra sobre os oxigênios das hidroxilas, levando a conclusão de que estes seriam o provável sítio de redução da molécula.

Este resultado concorda com os dados voltamétricos que dão indícios de um par redox na oxirredução da MDP, já que os potenciais de oxidação e redução são bem próximos.

Figura 46 - Distribuição de densidade eletrônica para o orbital HOMO da molécula de MDP em duas perspectivas.



Fonte: O próprio autor.

Como dado complementar ao cálculo de densidade eletrônica dos orbitais foram calculadas as cargas de Mulliken para a MDP.

A Figura 47 apresenta a estrutura tridimensional geometrizada em duas perspectivas e a Tabela 5 apresenta os dados calculados para as cargas de Mulliken da molécula de MDP.

Observa-se que os oxigênios da molécula (oxigênios 7, 8, 12 e 13) apresentam as maiores densidades de carga, sendo estes os sítios mais propícios a sofrerem oxidação. Entretanto, observou-se anteriormente que os orbitais HOMO e LUMO encontram-se localizados principalmente sobre os oxigênios 7 e 8 e não foram observados sobre os oxigênios 12 e 13.

Dados da literatura mostram que os orbitais HOMO e LUMO em moléculas fenólicas localizam-se preferencialmente sobre o grupo fenólico. Desta forma, pode-se

concluir que os dados de carga de Mulliken mostram os oxigênios fenólicos como os possível sítio de oxirredução da molécula de MDP.⁷¹

Figura 47 - Representação da estrutura tridimensional geometrizada da molécula de MDP em duas perspectivas diferentes.

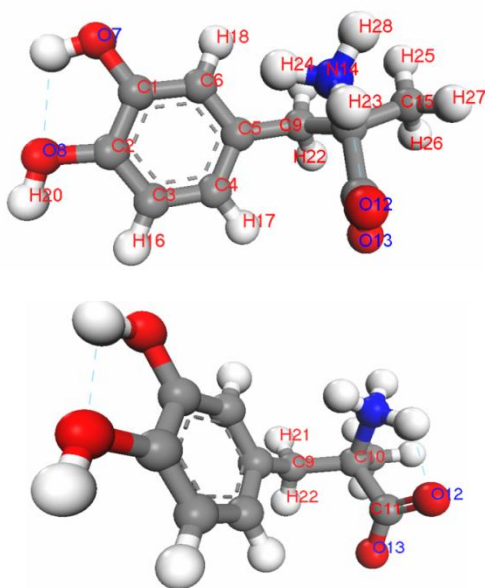


Tabela 11: Valores das cargas de Mulliken calculadas para os átomos numerados na estrutura.

Cargas atômicas de Mulliken	
C 1	0.300
C2	0.290
C3	-0.140
C4	-0.102
C5	0.058
C6	-0.171
O7	-0.504
O8	-0.513
C9	-0.137
C10	-0.032
C11	0.500
O12	-0.640
O13	-0.609
N14	-0.159
C15	-0.167

Fonte o próprio autor.

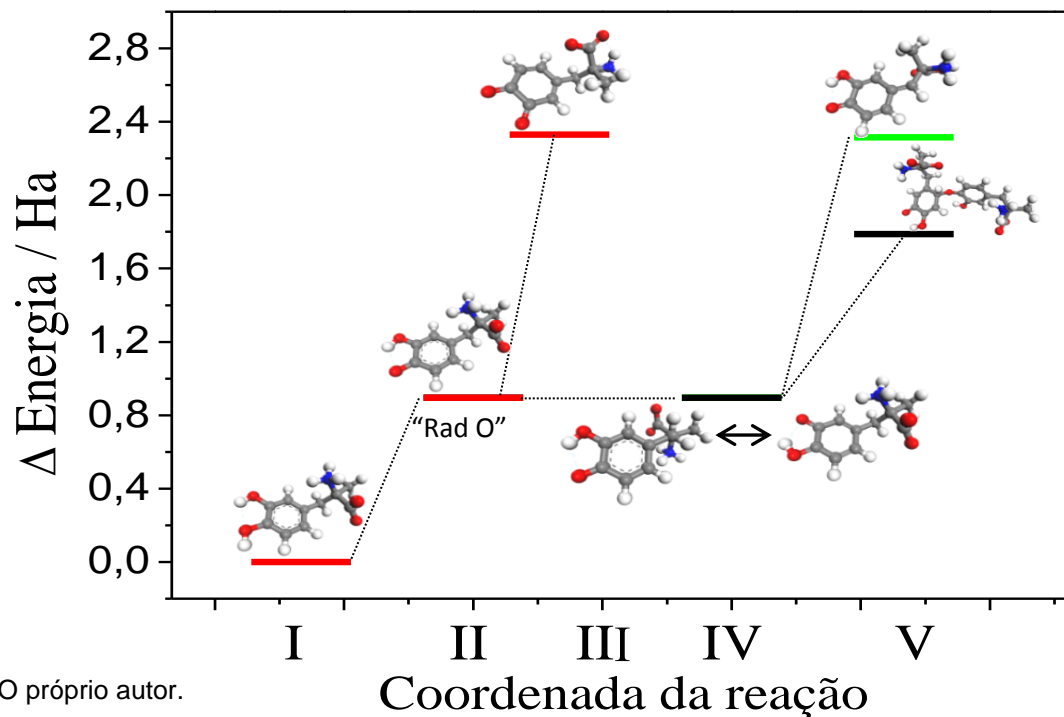
Após o estudo dos parâmetros moleculares e cargas de Mulliken, foi feito o cálculo das energias das moléculas em cada etapa do mecanismo proposto no tópico 4.2.2.1. Além disto, foram propostas rotas alternativas de suposta competição com o mecanismo proposto para validar o cálculo.

A Figura 48 apresenta um gráfico da variação de energia para os intermediários reacionais e produtos gerados em cada etapa do mecanismo.

Na primeira etapa dos cálculos computacionais foi proposta a retirada do H19 e H20 resultando em um ganho de energia para a molécula gerada, 562,458 kcal mol⁻¹ e 561,624 kcal mol⁻¹. Desta forma, foi visto que a saída do “H”₂₀ seria a rota mais provável seguida da perda do primeiro elétron, o que geraria um radical indicado como “Rad O” no gráfico com energia de 561,968 Kcal mol⁻¹. A etapa de formação de radical é uma etapa menos energética como pode ser visto, tanto nos dados eletroquímicos

como nos cálculos quânticos. Após a formação do radical há uma combinação de formas radicalares obtidas pela ressonância do radical inicial e possível polimerização na superfície eletródica.

Figura 48 - Variação de energia das estruturas da MDP em cada etapa do mecanismo redox.



Fonte: O próprio autor.

Uma rota reacional alternativa sugere a formação de um composto conhecido como “metideo” e não a dimerização. Sendo assim, a fim de verificar a rota reacional mais favorável, os cálculos para a formação desta espécie foram feitos e mostraram uma energia alta para a formação do “metideo”, $1453,34 \text{ Kcal mol}^{-1}$, o que inviabiliza este produto frente a mais baixa energia necessária para a dimerização. Além disto, o resultado já era esperado devido a obtenção do produto em ambas as rotas. Na formação do “metideo” há uma perda total da ressonância, o que não acontece na dimerização como mostrado na Figura 48.

Já a oxidação total da molécula de MDP apresentou uma alta energia, em torno de $1461,64 \text{ Kcal mol}^{-1}$, como esperado, visto o alto potencial necessário para a oxidação total da mesma.

4.2.4. Estudo de voltametria de onda quadrada

Assim como para a molécula de DES, um estudo da influência dos parâmetros de aplicação de pulso voltamétrico sobre a oxidação da metildopa foi feito. O estudo teve como objetivo determinar os melhores parâmetros para o estudo eletroanalítico da MDP.

4.2.3.1 Frequência de aplicação de pulso de potencial

O primeiro parâmetro estudado foi a frequência de pulso, o principal parâmetro da resposta voltamétrica.

A Figura 49 mostra os voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 2, com frequência de aplicação de pulso variando de 8 a 70 s^{-1} . Para tanto, os valores de amplitude e incremento de potencial foram fixados em 50 mV e 2 mV respectivamente, valores tomados de acordo com Lovric.⁴²

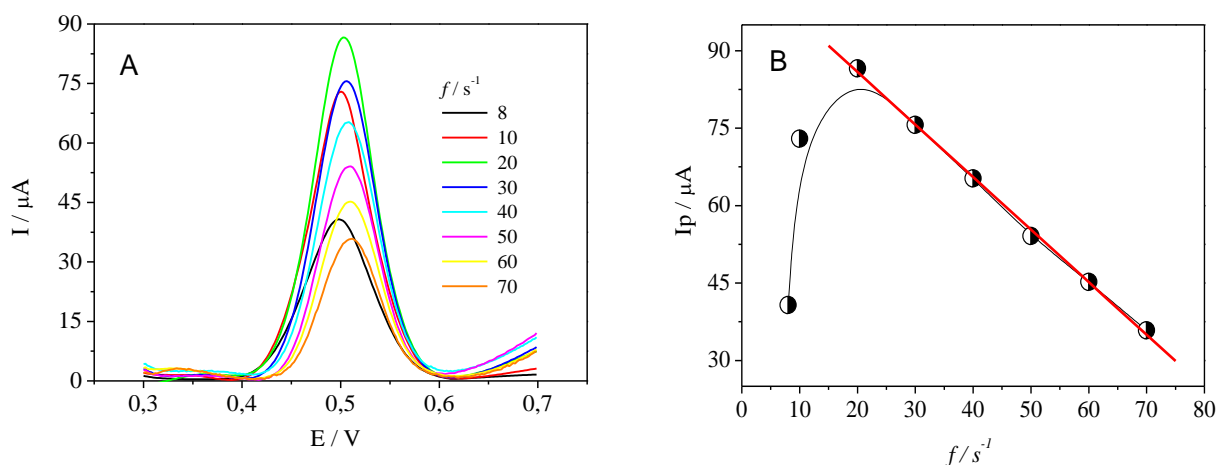
Os voltamogramas apresentados na Figura 49A revelaram um perfil voltamétrico bem definido em todos os valores de frequência estudados. Um pequeno deslocamento de potencial de pico para valores mais positivos foi observado com o aumento da frequência. Não foi visualizado um aumento significativo da largura de meia altura dos voltamogramas.

Os valores de corrente de pico obtidos em cada voltamograma foram grafados em relação à frequência aplicada, e o resultado segue apresentado na Figura 49B. A relação estudada mostrou um aumento significativo da corrente de pico para os primeiros valores de pulso aplicado, com um máximo de corrente em 20 s^{-1} . Após este valor foi observada uma diminuição de forma linear das correntes de pico até o último valor de frequência estudada.

O comportamento peculiar que este parâmetro apresentou na oxidação da metildopa deve estar associado a uma cinética de reação relativamente lenta, já que os maiores valores de corrente foram obtidos em valores intermediários, dentro da faixa de

frequência aplicada. Em altas frequências a velocidade de aplicação do pulso é muito mais rápida que a cinética reacional do composto, então, o que se observa é uma queda de corrente.

Figura 49 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), em diferentes frequências de pulso de potencial na faixa de 8 a 70 s^{-1} . (B): Relação entre a corrente de pico e a frequência de pulso de potencial. $a = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

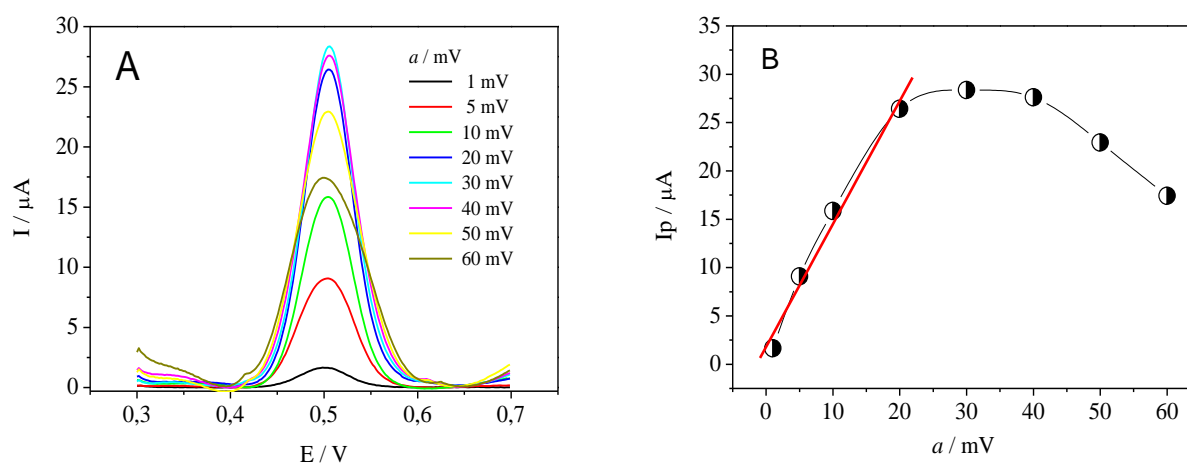
Para fins analíticos, o valor de frequência selecionado como ideal foi o de 20 s^{-1} , uma vez que neste valor de frequência a técnica apresentou uma maior sensibilidade.

4.2.3.2 Amplitude de pulso

Um outro fator bastante importante para determinações eletroanalíticas é a amplitude de pulso, uma vez que influencia na definição e sensibilidade do sinal analítico. Assim, foi feito um estudo para definir o melhor valor de amplitude para a determinação da MDP.

A Figura 50 apresenta o estudo da amplitude de pulso para a oxidação da MDP em meio de tampão BR pH 2. O parâmetro foi avaliado na faixa de 10 a 60 mV, para isto foi utilizada uma solução de MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A frequência e o incremento de varredura foram mantidos constantes, 20 s^{-1} para a frequência, valor otimizado anteriormente, e 2 mV para o incremento de varredura, valor padrão segundo a literatura.⁴²

Figura 50 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação do MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), em diferentes amplitudes de pulso de potencial na faixa de 10 a 60 mV. (B): Relação entre a corrente de pico e a amplitude de pulso. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: próprio autor.

Os voltamogramas de onda quadrada em diferentes amplitudes mostraram uma considerável influência deste parâmetro no sinal analítico da MDP, Figura 50A. Observou-se que os voltamogramas apresentaram uma melhora significativa da sua resolução quando se variou a amplitude de 1 a 30 mV e em valores maiores que 30 mV houve uma redução na intensidade da resposta.

A partir dos valores de corrente de pico foi grafada a relação entre a corrente de pico do processo e a amplitude aplicada, como está mostrada Figura 50B. Observou-se um aumento linear da corrente de pico até a amplitude de 20 mV, a partir de 30 mV não se verificou um crescimento de corrente, mas sim uma estabilização

desta até 40 mV e, em seguida, decréscimo considerável da corrente de pico do processo.

Visando uma melhor sensibilidade, pelos dados apresentados foi selecionada a amplitude de 20 mV como amplitude ótima para a determinação eletroanalítica da MDP.

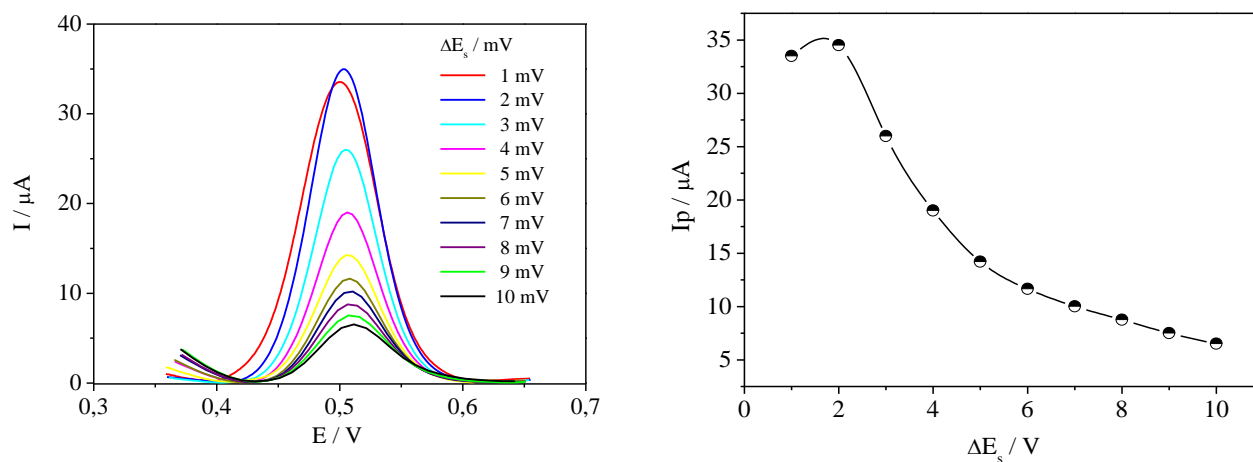
4.2.3.3 Incremento de varredura

Por último, foi feito um estudo do incremento de varredura mais adequado à determinação da MDP. A Figura 51 apresenta os resultados para este estudo. Foi utilizada uma solução de MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2, e os parâmetros anteriormente determinados foram fixados em seus valores escolhidos, frequência de 20 s^{-1} e amplitude 20 mV.

Nos voltamogramas foi possível observar um pequeno aumento de corrente entre os valores de 1 e 2 mV de incremento, e a partir deste valor houve um decréscimo de corrente, comportamento semelhante ao obtido no estudo de frequência, entretanto, de forma não linear, Figura 51B.

Este comportamento se deve, possivelmente, devido a cinética de transferência de carga relativamente lenta da oxidação da MDP, como já discutido anteriormente. O aumento do valor de incremento de varredura confere maior velocidade na aplicação do pulso de potencial. No caso da MDP, altos valores de incremento são inadequados à sua oxidação, o que proporciona uma redução drástica da corrente visualizada, uma vez que com altas velocidades não é dado tempo suficiente para que a reação redox ocorra.

Figura 51 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para oxidação da MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), em diferentes incrementos de varredura. (B): Relação entre I_p e o incremento de varredura. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

Com base no comportamento apresentado, para fins analíticos, foi escolhido o valor de 2 mV como incremento mais adequado à determinação eletroanalítica da MDP.

4.2.3.4 Estudo das componentes de corrente

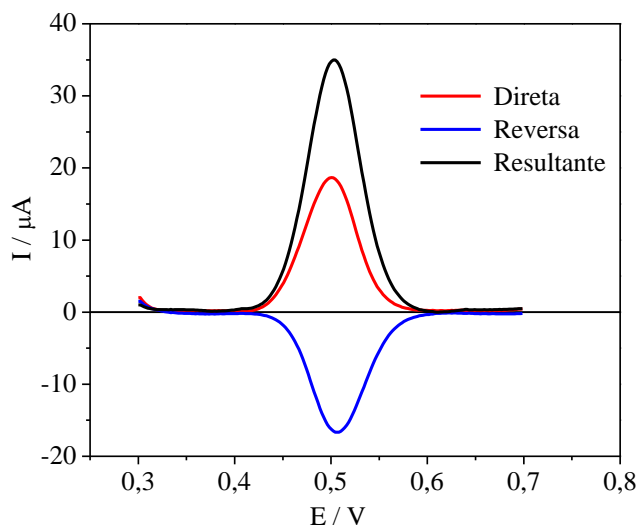
Após a definição dos parâmetros da voltametria de onda quadrada foi feito um estudo das componentes de corrente a fim de definir a melhor condição para aplicação da técnica como método analítico.

A Figura 52 apresenta as componentes direta, inversa e resultante para a voltametria de onda quadrada da MDP em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). Os parâmetros utilizados foram: $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Foi possível observar um comportamento típico de sistema quase reversível para a oxidação da MDP, já que as componentes direta e reversa apresentaram valores de corrente próximos, sendo a componente direta com o maior valor de corrente, e um pequeno deslocamento de potencial de pico entre as componentes.

Para aplicação em uma metodologia analítica foi escolhido trabalhar com a componente resultante, visto que esta apresenta um aumento significativo de corrente, inerente da quase reversibilidade do processo redox da MDP.

Figura 52 - Componentes de corrente para o MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

4.2.5. Determinação Eletroanalítica

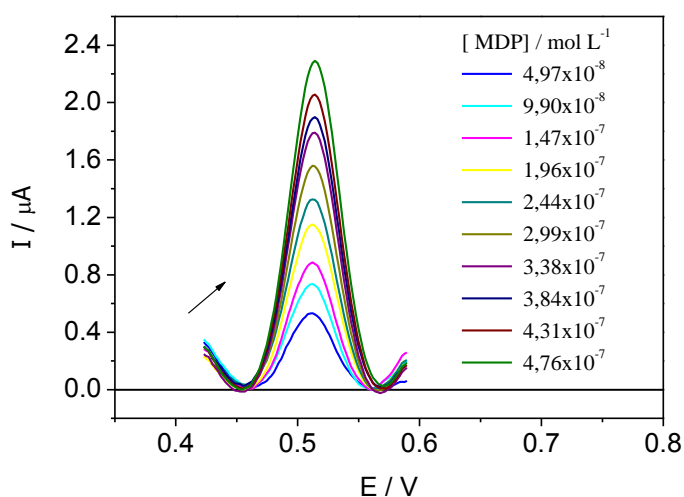
4.2.5.1 Construção das curvas analíticas

Após a otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada foram construídas curvas analíticas, etapa fundamental no desenvolvimento de uma metodologia analítica.

Os parâmetros voltamétricos utilizados para esta etapa foram os otimizados no subtópico anterior: $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e o meio eletrolítico selecionado para o estudo analítico foi o tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2. A metodologia analítica empregada foi semelhante à utilizada para a determinação do DES (subtópico 4.1.5.1), entretanto, as adições feitas foram de $25 \mu\text{L}$ da solução padrão de MDP $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ totalizado 10 adições ao final.

A Figura 53 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos, para cada adição de MDP, na faixa de potencial de 0,4 a 0,6 V. A faixa de concentração estudada para a construção das curvas analíticas foi de $4,97 \times 10^{-8}$ a $4,76 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Figura 53 - Voltamogramas de onda quadrada para a oxidação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹, em concentrações variando de $4,97 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ a $4,76 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. $f = 20$ s⁻¹, $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV.



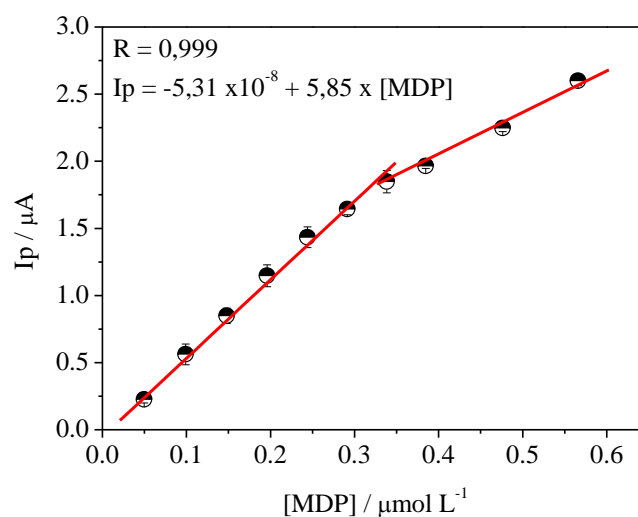
Fonte: O próprio autor.

Foi possível observar um crescimento proporcional na corrente de pico dos voltamogramas, notando-se uma pequena diminuição dos incrementos de corrente a partir nas últimas adições. O potencial redox se manteve constante em todas as concentrações, mostrando que nessas condições não se teve um efeito significativo da adsorção dos produtos da oxidação da MDP.

A partir das correntes de pico dos voltamogramas obtidos em cada concentração foram traçadas curvas analíticas, Figura 54. Observou-se uma ótima correlação linear, $R = 0,999$, na faixa de $4,97 \times 10^{-8}$ a $3,38 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, a partir deste valor houve uma mudança de inclinação, justificando a diminuição dos incrementos visualizados nos voltamogramas, possivelmente devido à adsorção de produtos da reação de oxidação da MDP sobre a superfície do eletrodo. É importante ressaltar que todas as medidas foram obtidas em quintuplicata e o resultado apresentado no gráfico

corresponde à curva analítica média onde cada ponto representa à média e desvio padrão das medidas.

Figura 54 - Curva analítica para MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir dos valores médios ($n = 5$) das correntes de pico com concentração variando de $4,97 \times 10^{-8}$ a $4,76 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, com suas respectivas barras de desvio padrão, em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2.



Fonte: O próprio autor.

Para fins de determinação analítica a faixa utilizada como região de trabalho foi a primeira região linear de $4,97 \times 10^{-8}$ a $3,38 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Nesta faixa, é importante ressaltar que o coeficiente angular da curva de trabalho foi de 5,85. Este valor mostra uma ótima sensibilidade para metodologias eletroanalíticas, visto que os valores de corrente de pico apresentaram valores com ordem de grandeza 10 vezes maiores que os respectivos valores de concentração, mostrando uma sensibilidade alta da superfície do eletrodo pelo analito e que os parâmetros otimizados quando combinados proporcionam uma boa metodologia analítica.

A equação da reta para a curva analítica com os respectivos intervalos de confiança de 95% para os valores dos coeficientes linear e angular são dadas por:

$$I_{\text{pico}} (\mu\text{A}) = -5,31 + 5,85 [\text{MDP}] \quad (11)$$

A partir das curvas analíticas construídas foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Para tanto, foi utilizado o desvio padrão do intercepto das curvas analíticas de acordo como o método recomendado pela ANVISA.⁴⁵

A Tabela 12 apresenta as figuras de mérito para a determinação eletroanalítica da metildopa com a metodologia proposta, onde são apresentadas a equação da reta, o coeficiente de correlação (r) da curva analítica, o desvio padrão do intercepto de cinco curvas (S_b), a inclinação da curva analítica (s), bem como o valor do limite de detecção (LD), do limite de quantificação (LQ), a repetibilidade e a reprodutibilidade.

Tabela 12 - Resultados obtidos a partir das curvas analíticas para MDP sobre superfície de carbono vítreo em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2. A varredura foi feita na faixa de potencial de 0,4 a 0,6 V. f = 20 s⁻¹, a = 20 mV, ΔEs = 2mV.

Parâmetro	Valor
Linearidade	4,97x10 ⁻⁸ a 3,38x10 ⁻⁷
Equação da reta	$i_p = 1,62 \times 10^{-8} + 5,66[\text{MDP}]$
R	0,999
S _e (A)	11,9 x 10 ⁻⁹
S (A/mol L ⁻¹)	5,66
LD (mol L ⁻¹)	6,32 x 10 ⁻⁹ (1,33 ppb)
LQ (mol L ⁻¹)	2,10 x 10 ⁻⁸ (4,43 ppb)
Repetibilidade (%)	3,01 (n = 10)
Reprodutibilidade (%)	4,96 (n = 5)

Fonte: O próprio autor.

4.2.5.2 Avaliação da precisão da metodologia

A avaliação da precisão foi feita investigando os parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade como avaliados no tópico 4.1.5.2.

Repetibilidade

A Tabela 13 apresenta os valores de corrente de pico para 10 medidas sucessivas da oxidação da MDP $9,90 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2.

Os valores obtidos mostraram uma boa repetibilidade dos dados analíticos, visto que não apresentaram uma variação significativa. A partir dos dados tabelados foi feito um tratamento estatístico e calculados os valores de média e desvio padrão, sendo $5,85 \pm 0.176 (10^{-7} \text{ A})$. Estes valores foram empregados no cálculo de RSD que apresentou um valor de 3,01% ($n = 10$), considerado adequado de acordo com a literatura.⁶¹

Tabela 13 - Estudos de repetibilidade das análises de MDP $9,90 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em eletrólito de suporte (Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Replicatas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$I_p / 10^{-7} \text{ A}$	5,93	6,08	5,98	5,84	5,57	5,95	5,62	5,83	5,67	6,02

Fonte: O próprio autor.

Repetibilidade intermediária

A Tabela 14 apresenta os valores de corrente de pico para 5 medidas voltamétricas da MDP $9,90 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas avaliados foram registrados em dias, solução estoque e tampão diferentes. De posse dos dados experimentais foi obtida a média e desvio padrão de $5,69 \pm 0,282 (10^{-7} \text{ A})$, e a partir deste resultado foi calculado um RSD de 4,96% ($n = 5$).

Tabela 14 - Estudos de repetibilidade intermediária das análises de MDP $5,66 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ sobre carbono vítreo em eletrólito de suporte (Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Replicatas	1	2	3	4	5
$I_p / 10^{-7} \text{ A}$	6,04	5,37	5,45	5,69	5,88

Fonte: O próprio autor.

Os dados mostraram uma boa reprodutibilidade das medidas, demonstrando que o procedimento apresentado para a determinação da MDP é considerado adequado e dentro dos requisitos estabelecidos pela ANVISA.⁶²

4.2.5.3 Curvas de Recuperação

De acordo com o procedimento aplicado no tópico 4.1.5.3 foram feitas curvas de recuperação para a MDP em eletrólito, fármaco, água natural e urina sintética, sendo o valor da contaminação de MDP (padrão) $9,90 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ referente ao segundo ponto da curva analítica previamente determinada.

Determinação em eletrólito suporte

A Figura 55 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a respectiva curva de recuperação para a MDP em eletrólito de suporte.

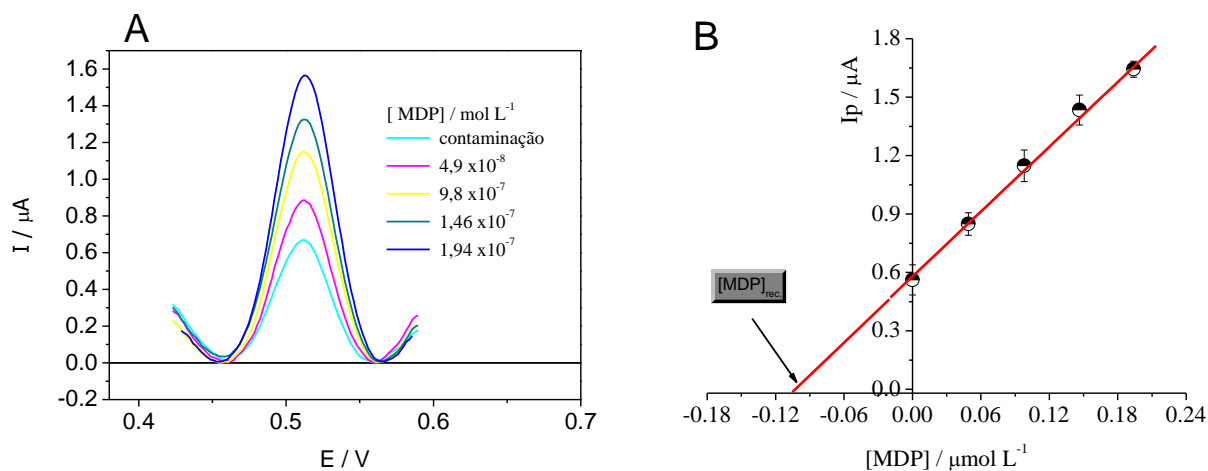
Foi possível observar na Figura 55A que não houve deslocamento dos potenciais de pico mais uma vez demonstrando que o produto não adere fortemente, se despreendendo da superfície eletródica por agitação intensa.

A Figura 55B mostra a curva de recuperação da MDP em eletrólito apresentando ótima correlação dos pontos medidos, com um $R = 0,999$, mostrando que na faixa estudada o método tem boa linearidade. A equação da reta para correlação da corrente de pico em função da concentração está apresentada na equação 12.

$$I_p = 5,79 \times 10^{-7} + 5,54 [MDP] \quad (12)$$

A partir da equação da curva de recuperação foi calculado o valor da concentração correspondente a contaminação com MDP e utilizando o valor foi calculado um valor de $105,06 \pm 5,26 \%$ de recuperação.

Figura 55 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico (n = 5). f = 20 s⁻¹, a = 20 mV, ΔEs = 2 mV.



Fonte: O próprio autor.

Determinação em formulação farmacêutica

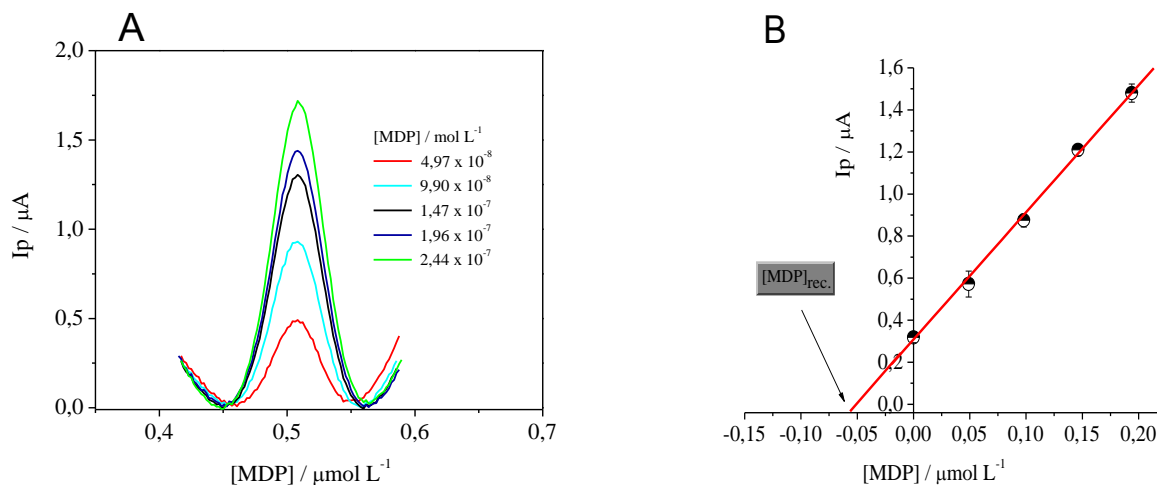
A determinação em formulação farmacêutica foi feita de acordo com o procedimento descrito no tópico 3.4.2.

A Figura 56 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e respectiva curva de recuperação para determinação de MDP em formulação farmacêutica.

Na determinação em amostra farmacêutica, apesar de apresentar uma formulação complexa, não proporcionou anomalia nos voltamogramas de onda quadrada, referentes aos componentes da formulação, Figura 56A.

Na Figura 56B observa-se a curva de recuperação. Esta apresentou ótima correlação linear, R = 0,999, indicando boa linearidade dos resultados e baixo nível de interferentes.

Figura 56 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em meio de tampão BR 0,04 mol L⁻¹. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico (n = 3). f = 20 s⁻¹, a = 20 mV, ΔEs = 2 mV.



Fonte: O proprio autor.

A equação da reta para correlação da corrente de pico em função da concentração está apresentada na equação 13, e a partir desta foi calculada a quantidade de analito recuperada pela técnica.

$$I_p = 3,80 \times 10^{-7} + 5,84[MDP] \quad (13)$$

A recuperação obtida para a formulação farmacêutica foi de 93,97% ± 3,2. A recuperação menor que 100% pode estar associada à incompleta extração do princípio ativo por ultrassom, levando a não dissolução completa do mesmo.

Recuperação em urina sintética

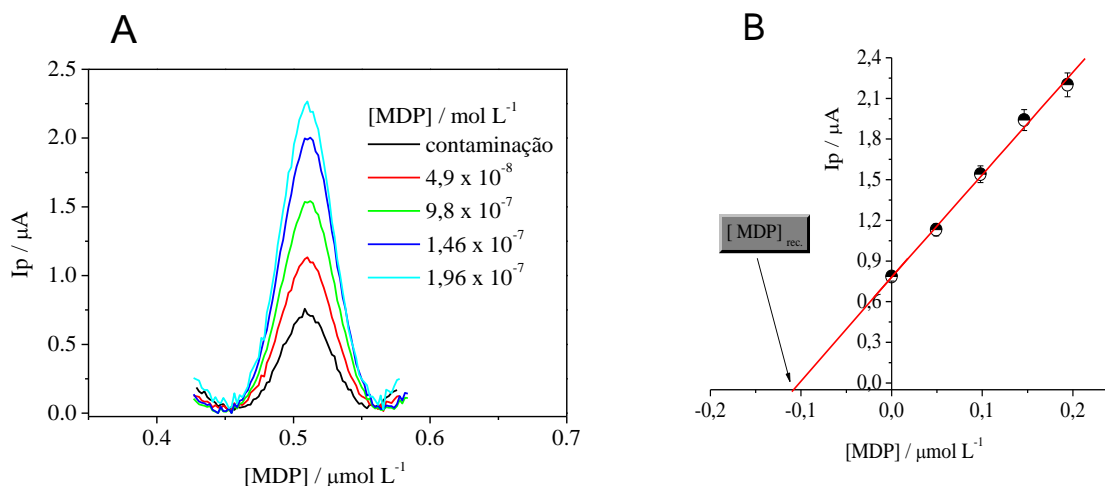
Um medicamento mesmo depois de ingerido pode retornar ao ambiente sem ter sido metabolizado. Dados científicos mostram que até 90% da dose terapêutica pode ser expelida pela urina sem sofrer alteração.⁷ Sendo assim, é fundamentalmente

importante que se possa determinar qual o teor de fármaco está sendo expelido juntamente com a urina.

Para tanto, neste estudo de determinação em urina fez-se uso de uma solução sintética, preparada de acordo com a literatura.⁷² A metodologia de determinação está descrita no tópico 3.4.7.2.

A Figura 57 apresenta os voltamogramas de onda quadrada típicos e a respectiva curva de recuperação em urina sintética.

Figura 57 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em urina sintética. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico (n = 3). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O próprio autor.

A complexidade da amostra de urina sintética proporcionou uma maior dificuldade na reprodutibilidade dos dados, além de um maior nível ruído nos voltamogramas, Figura 57A. Apesar disso, foi possível obter uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de MDP com um $R = 0,998$, demonstrando uma boa linearidade. A equação da reta referente à correlação entre a corrente de pico e a concentração de MDP está apresentada na equação 14.

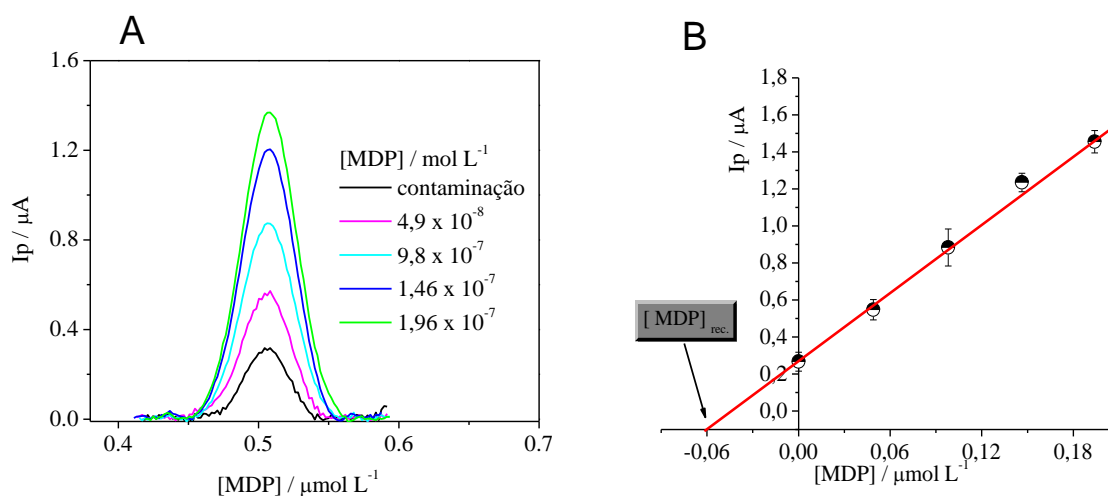
$$I_p = 7,80 \times 10^{-7} + 7,56 [MDP] \quad (14)$$

A partir da curva obtida foi calculada a concentração de analito recuperada, possibilitando o cálculo da porcentagem de recuperação em urina sintética, sendo o valor de $97,03\% \pm 8,04$. Como foi discutido anteriormente, o alto valor de variação na recuperação obtida neste eletrólito possivelmente está relacionado à maior complexidade da matriz utilizada. Entretanto, o valor de recuperação apresenta-se dentro do estabelecido pela ANVISA para medicamento e fármacos, segundo o órgão estes valores tem que estar entre 80% e 120%.⁶²

Recuperação em água natural

A Figura 58 apresenta os voltamogramas de onda quadrada típicos e a respectiva curva de recuperação em água natural.

Figura 58 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a recuperação de MDP sobre superfície de carbono vítreo em água natural. B) Curva de recuperação para o MDP sobre superfície de carbono vítreo, obtida a partir da média e respectivo desvio padrão das correntes de pico voltamétrico ($n = 3$). $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Fonte: O proprio autor.

A amostra de água natural utilizada foi coletada do açude Santo Anastácio, localizado no campus do Pici da universidade Federal do Ceará. Uma característica do açude é receber esgoto doméstico oriundo das comunidades que vivem as margens do açude. As amostras foram coletadas no período de julho de 2011, próximo ao lado oposto à barragem do açude.

O procedimento executado para determinação na amostra de água foi detalhado no subtópico 3.2.4. O resultado apresentou uma boa proporcionalidade entre os valores de corrente e a concentração, apesar da maior complexidade da amostra. A curva de recuperação, Figura 58B, forneceu um coeficiente de correlação de 0,995, considerado um ajuste ótimo para dados de correlação linear.⁶²

A equação da reta referente à correlação entre a corrente de pico e a concentração de MDP está apresentada na equação 15.

$$I_p = 3,27 \times 10^{-7} + 5,68 [MDP] \quad (15)$$

A partir da curva de recuperação foi possível calcular o valor recuperado e a partir deste, o percentual de recuperação médio de $91,29\% \pm 3,9$, um valor alto de recuperação se considerarmos a natureza da matriz estudada.

A Tabela 15 apresenta um resumo dos resultados das recuperações em diferentes eletrólitos. Em todos os meios estudados a metodologia apresentou valores de quantificação dentro do estabelecido na literatura, desta forma, pode-se apresentar como uma alternativa viável para este fim.

Tabela 15 - Resultados obtidos para a recuperação do MDP sobre superfície de carbono vítreo em eletrólito suporte, formulação comercial, urina sintética e água de rio. $f = 20 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Recuperação	[MDP] _{adic.} (mol L ⁻¹)	[MDP] _{rec.} (mol L ⁻¹)	% Rec.
Eletrólito	9,0 x 10 ⁻⁸	1,08 x 10 ⁻⁷	105,06% ± 5,26
Fármaco		8,46 x 10 ⁻⁸	93,97% ± 3,2
Urina Sintética		8,73 x 10 ⁻⁸	97,03% ± 8,04
Água natural		8,43 x 10 ⁻⁸	91,29 ± 3,9

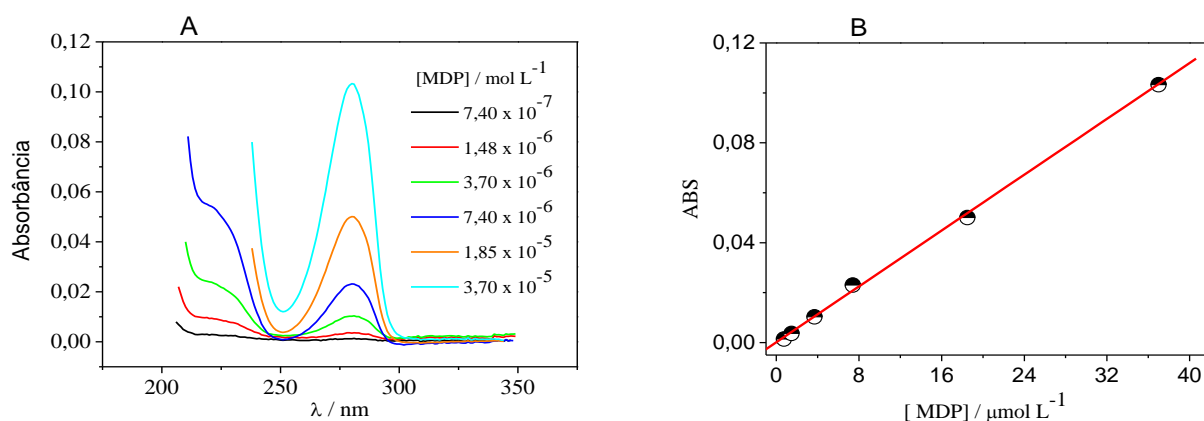
Fonte: O próprio autor.

4.2.5.4 Comparação com a técnica de UV-vis

Como comparação, foi feita a determinação da metildopa utilizando a técnica de UV-vis, de acordo com o método descrito na farmacopéia portuguesa.⁷³ A Figura 59 mostra os espectros de absorção obtidos para cada amostra de MDP utilizada.

As medidas apresentaram um máximo de absorbância em 280 nm, de acordo como os valores fornecidos pela literatura, Figura 59A. A partir dos valores de absorbância para cada concentração foi obtida a curva de calibração, Figura 59B.

Figura 59 - A) Espectros de UV-Vis para o padrão de MDP em meio aquoso no intervalo de concentração de: $7,40 \times 10^{-7}$ a $3,70 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. B) Curva analítica do DES obtida a partir dos experimentos de UV-Vis.



Fonte: O próprio autor.

Amostras de concentração conhecida foram preparadas em diferentes matrizes e determinadas a partir da curva de calibração obtida, Tabela 16.

Observando-se os valores de recuperação pode-se notar uma maior variação nas percentagens recuperadas em formulação comercial e urina sintética, sendo estes $95,70\% \pm 7,3$ e $108,10\% \pm 6,90$, respectivamente. Este resultado possivelmente está relacionado a natureza da matriz, uma vez que a menor seletividade das medidas de UV-Vis favorece uma maior interferência da matriz. Neste aspecto, as técnicas voltamétricas apresentam a vantagem de serem bem mais seletivas.

Tabela 16 - A) Resultados obtidos para a recuperação da MDP utilizando espectroscopia Uv-Vis, em formulação farmacêutica, água natural e urina sintética. $\lambda_{\text{max.}} = 280 \text{ nm}$.

Recuperação	[DES]_{adic.} (mol L⁻¹)	[DES]_{recup.} (mol L⁻¹)	% Recuperação
Formulação comercial	7,4 x 10 ⁻⁶	7,08 x 10 ⁻⁶	95,70% ± 7,3
Água de natural		8,54 x 10 ⁻⁶	115,50 % ± 1,34
Urina sintética		7,99 x 10 ⁻⁶	108,10% ± 6,90

Fonte: O próprio autor.

Na recuperação em água natural o resultado obtido foi de 115,5% ± 1,34. O alto valor também está relacionado a interferentes da matriz, possivelmente compostos orgânicos dissolvidos que absorvem em comprimento de onda próximo ao da MDP.

5 CONCLUSÕES

Para a molécula DES o estudo do pH mostrou uma dependência do processo redox com a concentração hidrogeniônica do meio, deslocando o potencial de pico anódico para valores mais negativos com o aumento do pH. Foi observada uma relação linear entre pH vs potencial de pico anódico na faixa de pH 2 e 8, com um coeficiente angular de 0,047 V/pH. A partir do pH 8 observou-se uma perda de linearidade, sendo este ponto de mudança da inclinação correlacionado ao pKa da molécula de DES, calculado entre 9 e 10. Cálculos quânticos foram feitos e possibilitaram a obtenção de dois valores de pKa, sendo estes de 9,13 e 9,73, o que confirmou os dados eletroquímicos.

Em relação a corrente do processo redox do DES foi observado nos voltamogramas cíclicos um máximo de corrente em pH 7, sendo este o valor utilizado para estudos analíticos e eletroquímicos posteriores, devido a maior sensibilidade da técnica neste pH. Estudos de voltametria cíclica mostraram que em pH 7 o potencial de oxidação e redução do DES foi de 0,450 V e 0,021 V, respectivamente. Além disto, estudos do número de ciclos voltamétricos mostraram que existe uma perda considerável de corrente do processo quando se faz ciclos consecutivos, ou seja, provavelmente ocorre adsorção do produto reacional à superfície eletródica.

Estudos de velocidade de varredura mostraram um deslocamento do potencial anódico e catódico (ΔE_p) com aumento da velocidade de varredura, o que indica que o processo redox do DES é quase reversível. A partir destes dados foi grafada a relação $\log I_p$ versus $\log v$ para o processo anódico e catódico, obtendo-se valores de coeficiente angular de 0,81 e 0,73, respectivamente. Estes valores, próximos de 1, sugerem que existe uma etapa de adsorção predominante no mecanismo redox do DES. Analisando em relação aos critérios de Nicholson-Shain foi possível caracterizar o processo como catalítico com transferência irreversível de carga.

Os dados eletroquímicos aliados a cálculos quânticos permitiram que uma proposta de mecanismo fosse feita . Os dados quânticos de energia dos orbitais HOMO

e LUMO mostraram que a oxidação completa do DES gera uma molécula de quinona, como previsto na proposta de mecanismo baseada nos dados experimentais.

A metodologia eletroanalítica foi desenvolvida utilizando a VOQ como técnica eletroquímica e o meio eletrolítico utilizado foi o tampão BR pH 7. Os parâmetros da VOQ otimizados foram $f = 80$ Hz, $a = 30$ mV, $\Delta E = 4$ mV. As Curvas analíticas mostraram uma boa correlação, possibilitando cálculos de LD e LQ de, $5,58 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (14,9 ppb) e $1,89 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (49,9 ppb), respectivamente. A repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas através do RSD, obtendo-se valores de 1,64% e 3,47%, respectivamente. A metodologia foi aplicada em formulação farmacêutica, água natural e urina sintética, obtendo-se recuperações de 94,32%, 77,85%, 89,00%, respectivamente. Estes valores mostraram que a metodologia segue valores de parâmetros especificados pela ANVISA.

Para a MDP os estudos voltamétricos, em pH 2 e 3, foram registrados apenas um processo anódico e um catódico, e em pH maior que 3 apresentaram dois picos anódicos e um catódico. Este dado mostrou uma sensível influência do pH do meio no processo redox da MDP.

Foi observada uma dependência dos potenciais de pico que se deslocaram para valores mais negativos com aumento do pH, sugerindo uma etapa de desprotonação no mecanismo redox.

Assim como para a DES, foi estudada a influência da velocidade de varredura, e a partir destes dados foi grafada a relação $\log I_p$ vs $\log v$ para o processo anódico e catódico obtendo-se inclinações de 0,95 e 1,02, respectivamente, indicando a ocorrência de adsorção das espécies. Em pHs acima de 3 foi observado um processo irreversível com formação de filme polimérico na superfície do eletrodo, evidenciado pela drástica redução da corrente de pico do processo com o número de ciclos. Em pH abaixo de 3 o processo apresentou um caráter reversível.

Cálculos quânticos e de carga de Mulliken juntamente com os dados eletroquímicos foram utilizados para elaborar uma proposta de mecanismo para a MDP. Os cálculos mostraram que a densidade eletrônica dos orbitais HOMO e LUMO estão, principalmente, sobre os oxigênios fenólicos e uma possível rota reacional com

formação de dímeros, e possível polimerização, é energeticamente viável, confirmando o mecanismo proposto a partir dos dados eletroquímicos.

A metodologia eletroanalítica foi desenvolvida também utilizando VOQ em meio de tampão BR pH 2 e os parâmetros otimizados foram: $f = 20$ Hz, $a = 20$ mV, $\Delta E = 2$ mV. Curvas analíticas foram obtidas e a partir destas calculados o LD e LQ de $6,32 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ (1,33 ppb) e $2,10 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (4,43 ppb), respectivamente. A repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas através do RSD, obtendo-se valores de 3,01% e 4,96%, respectivamente. A metodologia foi aplicada em formulação farmacêutica, água natural e urina sintética, obtendo-se recuperações de 93,32%, 97,03%, 91,29%, respectivamente.

O estudo apresentado possibilitou a compreensão de aspectos eletroquímicos das reações redox envolvidas nas moléculas de DES e MDP, além de possibilitar o desenvolvimento de metodologias para a determinação destes compostos em meios como urina sintética e água natural, com um nível de certeza respeitando os padrões analíticos vigentes.

6 REFERÊNCIAS

- 1 OLIVEIRA-BRETT, A.M. Electrochemistry for probing DNA damage. **Encyclopedia of Sensors**, v. 10, p. 1-14, 2006.
- 2 GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695–706, 2007.
- 3 MARCHI, M. R. R., *et al.* Hormônios estrogênicos no ambiente e eficiência das tecnologias de tratamento para a remoção em água e esgoto. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 13, p. 16-23, 2008.
- 4 BAREL-COHEN, K., *et al.* Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of environmental management**, v. 78, p. 16–23, 2006.
- 5 BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, p. 523–530, 2003.
- 6 MAIA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, p. 651–666, 2007.
- 7 GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica: New York: MacGraw-Hill, 2005.
- 8 ALVES, C., *et al.* Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, p. 1005–1014, 2007.
- 9 BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- 10 COMISSÃO DAS COMUNIDADE EUROPEIAS. **Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos: Substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais**, Bruselas , 1999.
- 11 BIRYOL, İ. *et al.* Voltammetric investigation of diethylstilbestrol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1227–1234, 2003.

- 12 FEI, J., *et al.* Electrochemical determination diethylstilbestrol by a single-walled carbon nanotube/platinum nanoparticle composite film electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 38, p. 1527–1533, 2008.
- 13 ZHANG, Q.-L. *et al.* Chemiluminescence screening assay for diethylstilbestrol in meat. **Food Chemistry**, v. 111, p. 498–502, 2008.
- 14 WANG, J. *et al.* Determination of diethylstilbestrol by enhancement of luminol–hydrogen peroxide–tetrasulfonated cobalt phthalocyanine chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 508, p. 171–176, 2004.
- 15 MARIA, K.; DUARTE, R.; MEIRELLES, C. F. Resíduos de anabolizantes na produção animal: importância e método de detecção. **Ciência Rural**, v. 32, p. 731–737, 2002.
- 16 *Instrução Normativa Nº 9, DE 30 DE MARÇO DE 2007*, Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:
<http://www.avimig.com.br/galeria_imagens/LEGISLACAO_23062008_235245.pdf>
Acesso em: 13 de Maio de 2009.
- 17 DUARTE, P. A. F., **Novos poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2005.
- 18 SECUNDO, F., *et al.* Rapid time-resolved fluoroimmunoassay for diethylstilbestrol in cow milk samples with a highly luminescent Tb³⁺ chelate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 221–225, 2012.
- 19 GABET, V.; MIÈGE, C.; BADOS, P.; COQUERY, M. Analysis of estrogens in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 1113–1131, 2007.
- 20 JIANG, X.; ZHAO, C.; JIANG, N.; ZHANG, H.; LIU, M. Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer for the analysis of diethylstilbestrol. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1061–1067, 2008.

- 21 LAFLEUR, A. D.; SCHUG, K. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Analytica chimica acta**, v. 696, p. 6–26, 2011.
- 22 CHEN, X.-B.; WU, Y.-L.; YANG, T. Simultaneous determination of clenbuterol, chloramphenicol and diethylstilbestrol in bovine milk by isotope dilution ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. B**, v. 879, p. 799–803, 2011.
- 23 YANG, Y.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Determination of diethylstilbestrol in milk using carbon nanotube-reinforced hollow fiber solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 97, p. 222–228, 2012.
- 24 DA CRUZ VIEIRA, I.; FATIBELLO-FILHO, O. Spectrophotometric determination of methyl dopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source. **Talanta**, v. 46, p. 559–564, 1998.
- 25 CHAMSAZ, M.; SAFAVI, A; FADAEE, Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbidopa, levodopa and methyl dopa in the presence of citrate with the aid of multivariate calibration and artificial neural networks. **Analytica chimica acta**, v. 603, 140–146, 2007.
- 26 **European Pharmacopeia**; 7th ed., 2005, p. 1417.
- 27 **The United States Pharmacopeia – The National Formulary – USP 30; NF- 25**, 2004, p. 1932.
- 28 ZHANG, S.; WU, K.; HU, S. Voltammetric determination of diethylstilbestrol at carbon paste electrode using cetylpyridine bromide as medium. **Talanta**, v. 58, p. 747–54, 2002.
- 29 BIN, Q., *et al.* Electrochemical behaviors of diethylstilbestrol and its application in pharmacokinetics. **Analytical biochemistry**, v. 336, p. 196-201, 2005.
- 30 LIU, S., *et al.* Electrochemical immunosensor based on mesoporous nanocomposites and HRP-functionalized nanoparticles bioconjugates for sensitivity enhanced detection of diethylstilbestrol. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 166-167, p. 562–568, 2012.

- 31 LU, D., *et al.* Synthesis of cyclodextrin-reduced graphene oxide hybrid nanosheets for sensitivity enhanced electrochemical determination of diethylstilbestrol. **Electrochimica Acta**, v. 85, p. 131-138, 2012.
- 32 NEMATOLLAHI, D., *et al.* Mechanistic study of the oxidation of catechol in the presence of secondary amines by digital simulation of cyclic voltammograms. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 591–595, 2004.
- 33 NEMATOLLAHI, D.; RAFIEE, M.; FOTOUHI, L. Mechanistic study of homogeneous reactions coupled with electrochemical oxidation of catechols. **Journal Of The Iranian Chemical Society**, v. 6, p. 448–476, 2009.
- 34 **Farmacopeia Brasileira**; 5th ed., 2005, p. 1143.
- 35 RIBEIRO, P. R. S., *et al.* Flow-injection spectrophotometric determination of methyl dopa in pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 67, 240–244, 2005.
- 36 GADKARIEM, E. A., *et al.* A new spectrophotometric method for the determination of methyl dopa. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, p. 289–293, 2009.
- 37 DE JONG, A P., *et al.* A new method for the determination of L-dopa and 3-O-methyl dopa in plasma and cerebrospinal fluid using gas chromatography and electron capture negative ion mass spectrometry. **Clinica chimica acta**, v. 171, p. 49-61, 1988.
- 38 RÓNA, K., *et al.* Determination of α methyl dopa in human plasma by validated high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of chromatography A**. v. 730, p. 125–131, 1996.
- 39 BLANDINI, F., *et al.* Simultaneous determination of L-dopa and 3-O-methyl dopa in human platelets and plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of chromatography**, v. 700, p. 278–282, 1997.
- 40 OLIVEIRA, C. H., *et al.* Quantification of methyl dopa in human plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry Application to a bioequivalence study. **Journal of chromatography. B**, v. 768, p. 341–348, 2002.

- 41 SHAHROKHIAN, S.; RASTGAR, S. Electrodeposition of Pt–Ru nanoparticles on multi-walled carbon nanotubes: Application in sensitive voltammetric determination of methyl dopa. **Electrochimica Acta**, v. 58, p. 125–133, 2011.
- 42 MISRCESKI, M. L. V., LOVRIC, S. K. **Square-wave voltammetry: Theory and application**. Berlin : Springer, 2007.
- 43 ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. C. **Computer Simulation of Liquids**, 1987.
- 44 LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines **Journal of Crystal Growth**, v. 233, p. 367–374, 2001.
- 45 ANVISA - RESOLUÇÃO-RE N° 899, de 29 de Maio de 2003. Disponível em: <<http://www.asfconsultoria.com.br/normas/ANVISA5.pdf>> Acesso em : 9 de Abril de 2010.
- 46 LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Átomo, 1998.
- 47 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; SWAIN, E.; ROBEY, C. **Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- 48 COMPTON, R. G. BANKS, C. E. **Understanding Voltammetry**. London: World Scientific, 2007.
- 49 Marvin Sketch Marvin Beans 5.3.2., ChemAxon Ltd 2010.
- 50 Revista eletrônica do departamento de química - UFSC. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/benzeno/efeitos2.html>>, Acesso em: 3 de Janeiro de 2013.
- 51 VEGA, D., *et al.* Electrochemical detection of phenolic estrogenic compounds at carbon nanotube-modified electrodes. **Talanta**, v. 71, p. 1031–1038, 2007.
- 52 SANTOS, K. D.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 80, p. 1999–2006, 2010.
- 53 BELHADJ TAHAR, N.; SAVALL, A. Electropolymerization of phenol on a vitreous carbon electrode in alkaline aqueous solution at different temperatures. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 465–469, 2009.

- 54 ANDREESCU, S.; ANDREESCU, D.; SADIK, O. A. A new electrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 681–688, 2003.
- 55 BOUDENNE, J. L.; CERCLIER, O.; BIANCO, P. Voltammetric Studies of the Behavior of Carbon Black during Phenol Oxidation on Ti/Pt Electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 145, p. 2763, 1998.
- 56 GOSSER JR., D. K. **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**. New York: VCH, 1993.
- 57 FRY, A. J. **Synthetic Organic Electrochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- 58 ALVES, R. *et al.* Estudo Eletroquímico E Químico-Quântico da Oxidação do Antidepressivo Tricíclico Amitriptilina. **Química Nova**, v. 28, p. 456–461, 2005.
- 59 ARROIO, A., *et al.* Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura - atividade. **Química Nova**, v. 33, p. 694–699, 2010.
- 60 GUADAGNINI, P. H., BRUNS, R. E. Cargas atômicas em moléculas. **Química Nova**, v. 19, p. 148–155, 1996.
- 61 MILLER, J. C., MILLER, J. N. **Estadística para química analítica**. Londres: Addison-Wesley Iberoamericana, 1988.
- 62 BEATRIZ, C., *Et al.* Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, v. 27, p. 771–780, 2004.
- 63 SKOOG, D. A.; WEST, D.M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. **Fundamento de Química Analítica**, São Paulo: Cengage Learning, 2008.
- 64 AFKHAMI, A. Investigation of the electrochemical behavior of some catecholamines in the presence of 4-aminobenzoic acid. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 5633–5640, 2005.
- 65 BIAN, C., *et al.* Electrochemistry of norepinephrine on carbon-coated nickel magnetic nanoparticles modified electrode and analytical applications. **Bioelectrochemistry**, v. 79, p. 1–5, 2010.
- 66 GIACOMELLI, C., *et al.* Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 332–338, 2002.

- 67 SAMET, Y.; KRAIEM, D.; ABDELHÉDI, R. Electropolymerization of phenol, o-nitrophenol and o-methoxyphenol on gold and carbon steel materials and their corrosion protection effects. **Progress in Organic Coatings**, v. 69, p. 335–343, 2010.
- 68 HEFFNER, J. *et al.* Using Cyclic Voltammetry and Molecular Modeling To Determine Substituent Effects in the One-Electron Reduction of Benzoquinones. **Journal of Chemical Education**, v. 75, p. 365, 1998.
- 69 BAKER, W. Mechanism of aromatic Side-chain Reactions with special reference to the polar effect of substituents. Part III. **Journal of Chemical Society**, p. 519–527, 1934.
- 70 SOLOMONS, T. W. G.; FRUHLE, C. B. **Química Orgânica**: Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- 71 EDDY, N. O. Experimental and theoretical studies on some amino acids and their potential activity as inhibitors for the corrosion of mild steel, part 2. **Journal of Advanced Research**, v. 2, p. 35–47, 2011.
- 72 Farmacopeia Portuguesa, 7th ed., 2002, p. 458.