



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE MORETTI SANCHES

**DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DOS HORMÔNIOS
17 α -ETINILESTRADIOL E ACETATO DE CIPROTERONA
UTILIZANDO ELETRODO DE DDB ACOPLADO A UM
SISTEMA FIA**

ALINE MORETTI SANCHES

**DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DOS HORMÔNIOS
17 α -ETINILESTRADIOL E ACETATO DE CIPROTERONA
UTILIZANDO ELETRODO DE DDB ACOPLADO A UM
SISTEMA FIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Roberta Antigo Medeiros.

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A194d Sanches, Aline Moretti Sanches.

Determinação amperométrica dos hormônios 17alfa-etinilestradiol e acetato de ciproterona utilizando eletrodo de DDB acoplado a um sistema FIA / Aline Moretti Sanches Sanches. - Londrina, 2019.
95 f. : il.

Orientador: Roberta Antigo Medeiros Medeiros.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Hormônios - Tese. 2. Análise por injeção em fluxo - Tese. 3. Diamante dopado com boro - Tese. 4. Amperometria - Tese. I. Medeiros, Roberta Antigo Medeiros. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

ALINE MORETTI SANCHES

**DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DOS HORMÔNIOS
17 α -ETINILESTRADIOL E ACETATO DE CIPROTERONA
UTILIZANDO ELETRODO DE DDB ACOPLADO A UM
SISTEMA FIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Antigo
Medeiros
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFR

Londrina, 22 de abril de 2019.

*Aos meus pais, Jorge e Maria, por
todo o amor incondicional e força para
continuar lutando.*

*À minha irmã, pela cumplicidade e
incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Roberta Antigo Medeiros pelo acolhimento, paciência, atenção, orientação e incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todo o aprendizado e conhecimento transmitido com muita determinação. Obrigada pela excelente professora e orientadora que é, a minha gratidão é imensa!

Ao Prof. Dr. Roberto de Matos, por toda ajuda e apoio.

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley pela disponibilidade no uso de reagentes e equipamentos.

Aos integrantes do LaEEM, LADEMA e GMPC – em especial à Juliana, Mayara, Vinícius e Fernando – pelo convívio e companheirismo.

Aos meus pais, Jorge e Maria, por todo o apoio, incentivo e amor incondicional. Vocês que enfrentaram quaisquer adversidade para que isso se tornasse mais uma etapa concluída. Vocês são o combustível para a minha caminhada. Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha irmã, Gabriela, pela amizade, determinação e força que transmite em mim! Você é um presente. Minha amiga para toda a vida.

À meu namorado John, pelos momentos de paciência e encorajamento, quando nem mesmo eu achei que seria capaz.

Aos meus amigos Bruna, Juliana e Max. Meu obrigada pelos estudos, compartilhamento de conhecimentos, por todo apoio, amizade, risadas e também pelos momentos de tensão. Sem vocês a caminhada teria sido mais árdua. Só desejo sucesso para vocês nessa longa jornada que é a vida.

À minha amiga e colega de laboratório, Juliana, pelo companheirismo durante todo o desenvolvimento de nossos trabalhos.

À minha amiga Jaqueline por tornar essa caminhada mais feliz e por todos os anos de amizade.

À todos os meus amigos e familiares, que torceram e estiveram juntos comigo.

“Tudo depende do tipo de lente que você utiliza para ver as coisas.”

(O mundo de Sofia)

SANCHES, Aline Moretti. **Determinação amperométrica dos hormônios 17 α -etinilestradiol e acetato de ciproterona utilizando eletrodo de DDB acoplado a um sistema FIA.** 2019. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2019.

RESUMO

O 17 α -etinilestradiol (EE2) e o acetato de ciproterona (CPA) são hormônios sintéticos muito utilizados em medicamentos contraceptivos e para controle de doenças, como câncer de próstata e também para androgenização e hirsutismo. Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos eletroanalíticos utilizando cronoamperometria e o eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente (EDDB-PTC), acoplado a um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), para a determinação dos hormônios EE2 e CPA em amostras de medicamentos, de urina sintética e água do lago Igapó. Por voltametria cíclica, foram observados picos de oxidação irreversíveis para o EE2 e CPA em 0,97 V e 1,60 V, respectivamente. Para o desenvolvimento dos métodos amperométricos foram otimizados parâmetros como potencial a ser aplicado (1,20 para EE2 e 1,80 para CPA), vazão (2,50 mL min⁻¹ para EE2 e 2,30 mL min⁻¹ para CPA) e volume da alça de amostragem (450,0 μ L para EE2 e 150,0 μ L para CPA). A curva analítica obtida para o EE2 apresentou-se linear na faixa de concentração de 0,070 a 10,0 μ mol L⁻¹ com um limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 0,023 μ mol L⁻¹ e 0,077 μ mol L⁻¹, respectivamente. Para o CPA a faixa linear de concentração foi de de 1,0 a 80,0 μ mol L⁻¹ com LD e LQ de 0,23 μ mol L⁻¹ e 0,75 μ mol L⁻¹, respectivamente. O método desenvolvido para o EE2 foi utilizado em estudos de adição e recuperação em amostras de água do lago Igapó e urina sintética, em que as recuperações variaram entre 94 e 106%. Para o CPA foram realizados estudos de adição e recuperação apenas em urina sintética na qual as recuperações foram de 98 e 99% para duas concentrações diferentes. Os métodos desenvolvidos foram empregados para a determinação de EE2 e CPA em medicamentos, os resultados foram satisfatórios e concordantes a um nível de confiança de 95% e com os resultados obtidos empregando-se um método de referência, no qual utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência.

Palavras-chave: Etinilestradiol, Ciproterona, Eletrodo de diamante dopado com boro, Amperometria, Análise por injeção em fluxo.

SANCHES, Aline Moretti. **Amperometric determination of the hormones 17 α -ethinylestradiol and cyproterone acetate using a BDD electrode coupled to a FIA system.** 2019. 95 p. Dissertation (Master in Chemistry) – State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The synthetic hormones 17 α -ethinylestradiol (EE2) and cyproterone acetate (CPA) are widely used in contraceptive and disease control drugs such as prostate cancer, androgenization and hirsutism. In this work two electroanalytical methods were developed using chronoamperometry and a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode (BDDE-PTC) coupled to a flow injection analysis (FIA) system for EE2 and CPA hormone determination in pharmaceutical formulations, synthetic urine and water from Igapó River. Using cyclic voltammetry it was observed an irreversible oxidation peak to EE2 and CPA at 0.97 and 1.60 V, respectively. For the development of the amperometric methods some parameters such as potential to be applied (1.20 V to EE2 and 1.80 V to CPA), flow rate (2.50 to EE2 and 2.30 mL min⁻¹ to CPA) and the injected volume (450 μ L to EE2 and 150 μ L to CPA) was optimized. The analytical curve obtained for EE2 were linear in the concentration range from 0.070 to 10.0 μ mol L⁻¹ with a limit of detection (LD) e quantification (LQ) of 0.023 and 0.077 μ mol L⁻¹, respectively. For the CPA, the analytical curve was linear in the concentration range from 1.0 to 80.0 μ mol L⁻¹ with LD and LQ of 0.232 and 0.75 μ mol L⁻¹, respectively. The developed method to the determination of EE2 was used for addition and recovery studies in Igapó River and synthetic urine samples, which the recoveries ranged from 94 and 96% at two different concentrations of CPA. These methods were applied in the determination of EE2 and CPA in pharmaceutical samples; the obtained results were satisfactory and consistent with the obtained using high performance liquid chromatography (HPLC), as comparative method, at a confidence level of 95%.

Keywords: Ethinylestradiol, Cyproterone acetate, Boron Doped Diamond, Amperometry, Flow injection analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura molecular dos hormônios E2 e EE2. 19
- Figura 2** – Estrutura molecular do hormônio CPA. 25
- Figura 3** – Esquema ilustrativo das diferentes terminações superficiais do EDDB ao se realizar os pré-tratamentos anódico (PTA) e catódico (PTC) em sua superfície. .32
- Figura 4** - Adaptador para o eletrodo de trabalho (EDDB). 39
- Figura 5** – Esquema do sistema FIA em linha única acoplada a célula eletroquímica. (1) bomba peristáltica; (2) injetor de amostra; (3) célula eletroquímica *wall-jet*/camada delgada; (4) potenciostato/galvanostato e (5) computador (sistema GPES). 40
- Figura 6** – Fotografia mostrando a célula eletroquímica *wall-jet*/camada delgada. 1 – adaptador *o-ring* para o encaixe do EDDB; 2 – célula fechada; 3 – eletrodo de referência; 4 – célula montada com (a) eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), (b) eletrodo auxiliar (tubo de aço inox) e descarte, (c) eletrodo de trabalho (EDDB) e (d) linha de condução do sistema FIA. 41
- Figura 7** – **(A)** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 1,0 mmol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura de potencial (10 – 500 mV s⁻¹) utilizando um EDDB (área geométrica = 0,385 cm²). **(B)** Relação linear obtida de *I_p* vs. *v*^{1/2}. 46
- Figura 8** – Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 (15 % etanol v/v) na presença (—) de EE2 50,0 μmol L⁻¹ e na ausência (—) utilizando o EDDB-PTC. *v* = 50 mV s⁻¹. 47
- Figura 9** – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 (15 % etanol v/v) contendo EE2 50,0 μmol L⁻¹ utilizando o EDDB-PTA (—) e o EDDB-PTC (—). *v* = 50 mV s⁻¹. 48

- Figura 10** – Voltamogramas cíclicos obtidos para EE2 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte: tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 (—), tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} pH 2,0 (—), H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} (—) utilizando o EDDB-PTC. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 49
- Figura 11** – Voltamogramas cíclicos obtidos para EE2 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão BR 0,04 mol L^{-1} nos pHs: 2,0 (—), 4,0 (—), 6,0 (—), 8,0 (—) e 10,0 (—) utilizando um EDDB-PTC. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 50
- Figura 12** – Gráfico de distribuição das microespécies para o EE2.51
- Figura 13** – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para EE2 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0, em diferentes velocidades de varredura: (a – i: 10, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300 mV s^{-1}) utilizando o EDDB-PTC. (B) Dependência de I_p vs. $\nu^{1/2}$ para EE2. O gráfico inserido corresponde à dependência de $\log I_p$ vs. $\log \nu$ para o EE2.....53
- Figura 14** – Gráficos obtidos para (A) j vs. $\nu^{1/2}$ e (B) E_p vs. $\log \nu$54
- Figura 15** – Proposta de mecanismo para a reação de oxidação do EE2 na superfície do EDDB-PTC.....55
- Figura 16** – Voltamograma hidrodinâmico obtido para EE2 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 (15 % etanol v/v) utilizando o EDDB-PTC. Volume da injeção = 450,0 μL e vazão = 3,20 mL min^{-1} aplicando-se diferentes potenciais: 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,15; 1,20; 1,25 V.56
- Figura 17** – (A) Magnitude da média (N = 3) dos sinais de corrente obtido na oxidação do EE2 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função da vazão da solução carregadora (tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 (15 % etanol v/v), vazões: de 0,60; 1,10; 1,60; 1,90; 2,60; 3,20 e 3,80 mL min^{-1} . (B) Magnitude da média (N = 3) dos sinais de corrente obtido na oxidação do EE2 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão BR pH 2,0 (15 % etanol v/v) em função do volume da alça de amostragem: 50, 100, 150, 250, 350, 450 e 500,0 μL empregando-se o EDDB-PTC.57
- Figura 18** – Amperograma obtido utilizando o EDDB-PTC acoplado ao sistema FIA com a injeção de diferentes concentrações de EE2: (a – g): 0,07; 0,4; 0,8; 3,0; 5,0;

- 8,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; potencial aplicado: 1,20 V (tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 (15 % etanol v/v). **Gráfico Inserido:** Curva analítica obtida para o EE2 no intervalo de concentração de 0,07 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$59
- Figura 19** – Cromatogramas obtidos para o EE2 (a – g): 10, 30, 50, 70, 90, 200 e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($t = 4,80$ min; $\lambda = 220$ nm), fase móvel metanol/água (80:20 v/v) e vazão de 1,0 mL min^{-1} . **Gráfico inserido:** Curva analítica obtida para o EE2 na faixa de concentração de 10 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$66
- Figura 20** – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 na presença (—) de CPA 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e na ausência (—), utilizando o EDDB-PTC. $v = 50$ mV s^{-1}69
- Figura 21** – Voltamogramas cíclicos obtidos para em solução de tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 contendo CPA 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando e o EDDB-PTA (—) e o EDDB-PTC (—). $v = 50$ mV s^{-1}70
- Figura 22** – Voltamogramas cíclicos obtidos para CPA 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o EDDB-PTC em diferentes eletrólitos suporte: tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 (—), tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} pH 2,0 (—) e H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} (—) $v = 50$ mV s^{-1} . ..71
- Figura 23** – **(A)** Voltamogramas cíclicos obtidos para CPA 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o EDDB-PTC em diferentes concentrações hidrogeniônicas do tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 (—), 4,0 (—), 6,0 (—), 8,0 (—) e 10,0 (—). **(B)** Voltamogramas em pH 2,0 (—) e 4,0 (—). $v = 50$ mV s^{-1}72
- Figura 24** – **(A)** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 contendo CPA 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o EDDB-PTC em diferentes velocidades de varredura (a – j: 10, 30, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 mV s^{-1}). **(B)** Dependência I_p vs. $v^{1/2}$ para o CPA. O gráfico inserido corresponde à dependência do $\log I_p$ vs. $\log v$ para o CPA.73
- Figura 25** – Voltamograma hidrodinâmico obtido para CPA 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 utilizando o EDDB-PTC. Volume de injeção = 150,0 μL e vazão = 2,30 mL min^{-1} aplicando-se diferentes potenciais: 1,50; 1,60; 1,65; 1,70; 1,75; 1,80; 1,85; 1,90; 1,95 e 2,0 V.74

Figura 26 – (A) Magnitude da média (N = 3) dos sinais de corrente obtido na oxidação do CPA $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função da vazão da solução carregadora (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0) em vazões de: 0,60; 1,10; 1,60; 1,90; 2,30; 2,60; 3,60; 3,20, 3,80 e $4,40 \text{ mL min}^{-1}$ **(B)** Magnitude da média (N = 3) dos sinais de corrente obtido na oxidação do CPA $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 em função do volume da alça de amostragem: 50, 100, 150, 250, 350, 450 e $500,0 \mu\text{L}$ empregando o EDDB-PTC.76

Figura 27 – Amperograma obtido utilizando o EDDB-PTC acoplado ao sistema FIA com a injeção de diferentes concentrações de CPA (a – g): 1,0; 5,0; 8,0; 10,0; 30,0; 50,0 e $80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado: 1,80 V (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0). **Gráfico Inserido:** Curva analítica obtida para o CPA no intervalo de concentração de 1,0 a $80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ 78

Figura 28 – Cromatogramas obtidos para o CPA (a – g): 80, 100, 300, 500, 700, 900 e $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($t = 5,80 \text{ min}$; $\lambda = 220 \text{ nm}$), fase móvel metanol/água (80:20 v/v) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. **Gráfico inserido:** Curva analítica obtida para o CPA na faixa de concentração de 80 a $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$ 82

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas do EE2	20
Quadro 2 – Propriedades físico-químicas do CPA	26
Tabela 3 – Parâmetros estudados do sistema FIA para o EE2	58
Tabela 4 – Condições analíticas de métodos eletroanalíticos para a determinação do EE2 previamente reportado na literatura comparado ao método proposto	61
Tabela 5 – Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intra e entre-dias para o EE2	64
Tabela 6 – Erros relativos obtidos no estudo de interferentes para o EE2	64
Tabela 7 – Resultados obtidos na determinação de EE2 em amostras de medicamentos usando o método proposto e o método cromatográfico	66
Tabela 8 – Resultados obtidos na determinação de EE2 em amostras ambientais e biológicas	67
Tabela 9 – Parâmetros do sistema FIA.....	77
Tabela 10 – Condições analíticas de métodos eletroanalíticos para a determinação do CPA previamente reportado na literatura comparado ao método proposto.....	80
Tabela 11 – Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intra e entre-dias para o CPA.....	81
Tabela 12 – Erro relativo obtido no estudo de interferentes para o CPA	82
Tabela 13 – Resultados obtidos na determinação de CPA em amostra de medicamento usando o método proposto e o método cromatográfico	83
Tabela 14 – Estudo de adição e recuperação de CPA em amostra de urina.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α – Coeficiente de transferência eletrônica

A – área geométrica (cm²)

CA – Cronoamperometria

CA-FIA – Cronoamperometria acoplado ao sistema FIA

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos

CLAE-EM/EM – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

CPA – Acetato de ciproterona

CVD – Chemical vapor deposition (deposição química a vapor)

D₀ – Coeficiente de difusão

DDB – Diamante dopado com boro

DE – Desregulador endócrino

EE2 – 17 α -etinilestradiol

EDDB – Eletrodo de diamante dopado com boro

EDDB-PTA – Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anódicamente

EDDB-PTC – Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catódicamente

F – constante de Faraday

FIA – Flow injection analysis (análise por injeção em fluxo)

HPHT – High-pressure/high-temperature (alta pressão e alta temperatura)

I_p – Corrente de pico

K_{ow} – Constante de solubilidade octanol/água

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

pKa – Logaritmo da constante de acidez

PPD – Polarografia de pulso diferencial

S_w – Solubilidade em água

Tampão BR – Tampão de Britton-Robinson

v – Velocidade de varredura

VC – Voltametria cíclica

VOQ – Voltametria de onda quadrada

VPD – Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	17 α -ETINILESTRADIOL: IMPORTÂNCIA E MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO	18
1.2	ACETATO DE CIPROTERONA: IMPORTÂNCIA E MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO	24
1.3	ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO	28
1.4	VOLTAMETRIA CÍCLICA, CRONOAMPEROMETRIA E SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	33
2.	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	37
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	37
3.2	EQUIPAMENTOS	38
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	41
3.4	PREPARO DE AMOSTRAS	43
3.5	MÉTODO COMPARATIVO	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	DETERMINAÇÃO DA ÁREA ELETROATIVA DO EDDB	45
4.2	COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO EE2 SOBRE O EDDB	46
4.2.1	EFEITO DO pH E ELETRÓLITO SUPORTE PARA A DETERMINAÇÃO DO EE2	48
4.2.2	EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA	52
4.2.3	DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DO EE2 EMPREGANDO O EDDB-PTC.....	55
4.2.3.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA CRONOAMPEROMÉTRICA E DO SISTEMA FIA.....	55

4.2.3.2	CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E ESTUDO DE REPETIBILIDADE INTRA E ENTRE-DIAS.....	58
4.2.3.3	DETERMINAÇÃO DO EE2 EM AMOSTRA DE MEDICAMENTO, ÁGUA DO LAGO IGAPÓ E URINA SINTÉTICA UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	64
4.3	COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO CPA SOBRE EDDB.....	68
4.3.1	EFEITO DO pH E ELETRÓLITO SUPORTE.....	70
4.3.2	EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA.....	72
4.3.3	DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DO CPA EMPREGANDO O EDDB-PTC.....	74
4.3.3.1	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA CRONOAMPEROMÉTRICA E DO SISTEMA FIA.....	74
4.3.3.1	CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E ESTUDOS DE REPETIBILIDADE INTRA E ENTRE-DIAS.....	77
4.3.3.2	DETERMINAÇÃO DO CPA EM AMOSTRA DE MEDICAMENTO E URINA SINTÉTICA UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.....	81
5.	CONCLUSÕES.....	85
6.	REFERÊNCIAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

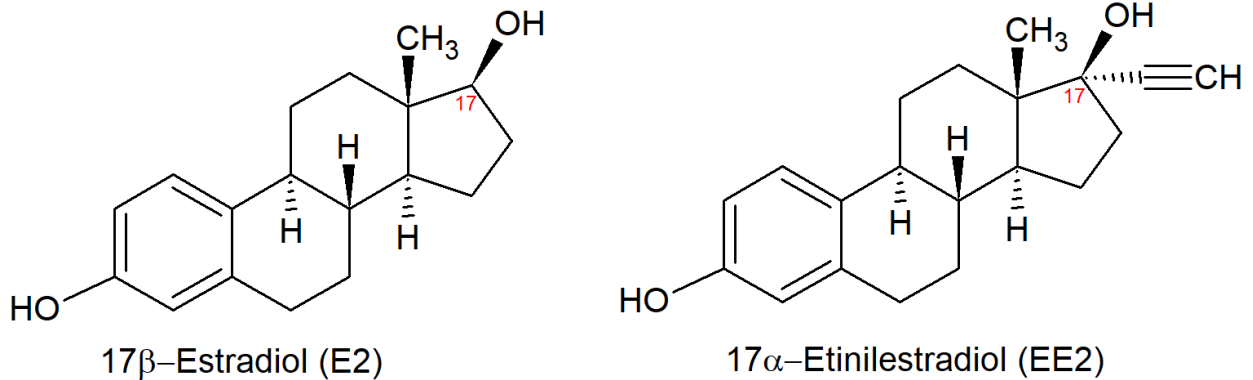
1.1 17 α -ETINILESTRADIOL: IMPORTÂNCIA E MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO

Os hormônios estrogênicos são um grupo de compostos biologicamente ativos, derivados do colesterol, que possuem estruturas moleculares semelhantes, sendo predominantemente hormônios femininos. Entre os hormônios naturais estão a estrona (E1), o estradiol (E2) e o estriol (E3) e há também um hormônio sintético chamado 17 α -etinilestradiol (EE2).

O EE2 ((8R, 9S, 13S, 14S, 17R)-17-etinil-13-metil-7, 8, 9, 11, 12, 14, 15,16-octahidro-6H-ciclopentafenantreno-3,17-diol) é um hormônio derivado do estrogênio natural 17 β -estradiol (E2), como mostrado na Figura 1, é muito utilizado em medicamentos orais combinado com outros hormônios. Tais medicamentos são usados para prevenção da gravidez, terapia de reposição hormonal e suspensão da amamentação. A maioria das pílulas contém entre 20 e 50 μ g de EE2 por comprimido e são ingeridas em doses diárias (FILHO et al., 2006; ARIS et al., 2014; BEAUSSE et al., 2004).

Em geral, estes hormônios apresentam afinidade em ligar-se aos receptores hormonais e, quando em excesso no organismo, podem causar a disfunção endócrina. Ou seja, são capazes de alterar a forma de comunicação do sistema endócrino e causar diversos distúrbios à saúde humana e animal (MA e YATES 2018; SIEGENTHALER et al., 2017; CAMPBELL et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2012; CARBALLA et al., 2004; MONTAGNER et al., 2017).

Figura 1 – Estrutura molecular dos hormônios E2 e EE2.



Fonte: O próprio autor.

A afinidade de ligação do EE2 aos receptores estrogênicos é de 1 a 2 vezes maior nos humanos quando comparado com a afinidade do E2, e pode chegar a ser até cinco vezes maiores em algumas espécies de peixes (MARTÍNEZ et al., 2012; LI et al., 2013). A elevada afinidade do EE2 aos receptores estrogênicos pode ser esclarecida pela introdução do grupamento etinil ao carbono 17, o que torna a molécula de EE2 extremamente resistente à degradação pelo fígado quando comparado à molécula de E2 (Figura 1), que é rapidamente inativada pelo fígado por absorção via oral. A função hidroxila, presente no carbono 17, tanto para o E2 quanto para o EE2, tende a reagir com os grupos carboxílicos de materiais húmicos associados ao solo e aos sedimentos, elevando o poder de sorção ao solo (YU et al., 2004; LIMA et al., 2012; LI et al., 2013).

O EE2 se mostra prejudicial quando em contato com o meio ambiente mesmo em baixas concentrações, sendo que a maior fonte de eliminação do EE2 é através da urina e fezes. De acordo com a literatura, até 40% das doses de estrogênios sintéticos ministrados podem ser disponibilizados para o ambiente (PANTER et al., 1999; JOHNSON e WILLIAMS 2004; PAUWELS et al., 2008; MES et al., 2005; BARREIROS et al., 2016; MA e YATES 2018).

Quando excretado como efluente, o EE2 pode causar efeitos adversos para os animais aquáticos, como a feminilização e ao

hermafroditismo em peixes; diminuição na eclosão de ovos; modificações comportamentais como agressividade, movimentação e histopatologias. Em humanos, de acordo com estudos apresentados na literatura, há evidências de que seu excesso no organismo pode aumentar a incidência de câncer de mama e de testículo, a má formação dos processos reprodutivos; além da redução da fertilidade masculina através da redução de esperma e má formação congênita em crianças (SOLOMON e SCHETTLER 2000; KIDD et al., 2007; VALLEJO et al., 2010; MARTÍNEZ et al., 2012; SILVA et al., 2012; BOVIER et al., 2018).

O destino e o comportamento de compostos orgânicos no ambiente são influenciados por suas propriedades físico-químicas. Como apresentado no Quadro 1, o EE2 possui uma baixa solubilidade em água ($4,80 \text{ mg L}^{-1}$) quando comparado aos estrogênios naturais que possuem solubilidade em torno de $13,0 \text{ mg L}^{-1}$. Além disso, o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) igual a 4,15 indica maior hidrofobicidade da molécula, alto poder de sorção e persistência em se bioacumular nos sedimentos e na biota (ARIS et al., 2014; FILHO et al., 2006; SCALABENUZZI et al., 2018; BARREIROS et al., 2016; AURIOL et al., 2006).

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas do EE2

Nome	MM (g mol^{-1})	Sw (mg L^{-1})	Log Kow	pKa
17 α -etinilestradiol	296,41	4,80	4,15	10,40

Fonte: Adaptado de Silva et al., (2012).

MM: Massa molar

Sw: Solubilidade em água

Log Kow: Logaritmo da constante de partição octanol/água

pKa: Produto da constante de acidez

Alguns autores relataram em trabalhos na literatura a presença de EE2 em águas residuais e águas superficiais e/ou como efluentes em estações de tratamento de esgoto (ETE's) em concentrações que variaram

entre $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} (LARCHER et al., 2013; CARGOUET et al., 2004; COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET 2010; XU et al., 2012; ATKINSON et al., 2012; RA et al., 2011).

O lançamento de efluentes *in natura* ou mesmo processados são as principais vias de contaminação dos corpos aquáticos. No Brasil, o índice de tratamento de esgoto ainda é considerado baixo. Além disso, nos tratamentos convencionais de água e esgoto, não é possível remover completamente essas substâncias, ou seja, esses hormônios podem ser encontrados inclusive na água potável (BILA e DEZOTTI 2007; JOHNSON e WILLIAMS et al., 2004; JOSS et al., 2004; COMBALBERT e HERNANDEZ-RAQUET 2010; BOVIER et al., 2018; MA e YATES 2018).

Na resolução do CONAMA 430/2011 que trata da questão do lançamento de efluentes em corpos d'água receptores, não há o estabelecimento de limites máximos de EE2 permitidos sem que haja interferência ou danos nos seres vivos.

Contudo, o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação e monitoramento deste hormônio se faz necessário. As técnicas mais empregadas na determinação e quantificação do hormônio EE2 são técnicas instrumentais tradicionais como cromatografia e a espectrofotometria. Na literatura encontram-se alguns trabalhos descrevendo métodos para a determinação de EE2, utilizando CLAE-DAD (VERBINNEN e NUNES 2010), CLAE-EM/EM (NAIR et al., 2018), CLAE-EM/EM (RIPOLLÉS et al., 2014).

Alguns procedimentos eletroquímicos empregando técnicas voltamétricas e amperométricas também foram reportados na literatura, seja para determinação simultânea ou individual do EE2 utilizando diferentes eletrodos de trabalho.

No trabalho de Bond e Heritage (1984) foi utilizado um eletrodo gotejante de mercúrio e a voltametria de redissolução catódica para a determinação do EE2 em amostras farmacêuticas. A faixa linear de concentração obtida foi de 0,04 a 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-4} \mu\text{mol L}^{-1}$.

Ghoneim e colaboradores (2016) desenvolveram uma metodologia voltamétrica para a quantificação de EE2 em amostras farmacêuticas, soro e plasma humano. Utilizaram a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) e um eletrodo de gota pendente de mercúrio. A faixa linear de concentração foi de 0,0019 a 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e o LD e LQ foram de 0,0059 e 0,0019 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Para as amostras de soro e plasma humano, foram obtidos valores de LD de 0,00087 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,003 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Para a amostra de medicamento, o valor obtido pelo método proposto e o método de referência (espectrofotométrico) não variaram estatisticamente a um nível de confiança de 95%.

Li (2007) estudou o comportamento eletroquímico e a quantificação do EE2 em amostras farmacêuticas utilizando um eletrodo de pasta de carbono na presença do surfactante catiônico brometo de cetilpiridínio. Foi obtido um pico anódico de oxidação em +0,54 V em tampão fosfato pH 8,0. A faixa linear de concentração foi de 0,05 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LD foi de 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método desenvolvido foi empregado em amostra de medicamento que obteve um desvio padrão relativo de 4,16% e não apresentou diferença significativa quando comparado ao método de referência (CLAE).

Martinez e colaboradores (2012) desenvolveram um método voltamétrico para a determinação do EE2 usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de múltiplas paredes e partículas magnéticas funcionalizados com grupos amino, como suporte de imobilização de bioafinidade para capturar e pré-concentrar o EE2. O ácido sulfúrico pH 2,0 (10 mmol L^{-1}) foi usado como eletrólito suporte. O valor de LD foi de $3,37 \times 10^{-8} \mu\text{mol L}^{-1}$, com a faixa de concentração linear de $1,02 \times 10^{-7}$ a $2,36 \times 10^{-4} \mu\text{mol L}^{-1}$. Os autores empregaram o método na determinação de EE2 em estudos de adição e recuperação de 5,0 e 10,0 ng L^{-1} em amostras de água de 3 rios na Argentina e água de torneira, em que as recuperações variaram de 97 a 105%.

Pavinatto et al. (2015) desenvolveram um sensor com filmes nanoestruturados *layer-by-layer* (formados por quitosana e nanotubos de

carbono de múltiplas paredes em um substrato de óxido de estanho dopado com flúor). O pico de oxidação do EE2 foi observado em +0,60 V usando o tampão fosfato pH 7,0 como eletrólito suporte em voltametria de onda quadrada (VOQ). A faixa linear de concentração foi de 0,050 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um LD de 0,090 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método desenvolvido foi utilizado em estudos de adição e recuperação em amostras de urina sintética em concentrações de 1, 5 e 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no qual foram obtidas recuperações de 101, 98,8 e 106% respectivamente.

Nunes et al. (2016) desenvolveram uma metodologia para determinar EE2 em amostras de água do rio Guarapuava usando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD). Os autores utilizaram o eletrodo de gota pendente de mercúrio e o tampão BR pH 7,0 como eletrólito suporte. A faixa linear de concentração obtida foi de 0,00675 a 0,324 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um tempo de acumulação de 150 s. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,00155 e 0,00550 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método desenvolvido foi utilizado em testes de adição e recuperação em água natural do Rio Guarapuava que apresentaram recuperações entre 94 e 103%.

Smajador e colaboradores (2017) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com *carbon black* para a determinação de EE2 empregando a técnica VPD. A faixa linear de concentração obtida foi de 0,25 a 3,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LD foi de 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método desenvolvido foi utilizado na determinação de EE2 em amostras farmacêuticas em que foram obtidos valores de recuperação de 95 a 106%.

Perez et al. (2016) utilizaram o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) pré-tratado catódicamente (PTC) para a determinação de EE2 utilizando a voltametria de onda quadrada. Foi obtido um pico de oxidação irreversível em +0,65 V usando como eletrólito suporte o tampão BR pH 8,0. A linearidade foi obtida nas concentrações de 0,99 a 5,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores de LD e LQ foram de 0,240 e 0,790 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi utilizado em estudos de adição e recuperação em duas amostras de água da represa Billings na região metropolitana de São Paulo,

em concentrações de EE2 de 0,89 e 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtendo-se recuperações de 95 e 104 e 86 e 114%, respectivamente.

Os trabalhos eletroquímicos encontrados na literatura para a determinação do EE2 utilizaram, em sua maioria, eletrodos modificados e eletrodos de mercúrio. Entretanto, o uso de eletrodos modificados, geralmente, necessita de um maior tempo para o preparo, e pode haver problemas com relação à precisão do método devido à dificuldade na reprodução da modificação do eletrodo. Os eletrodos de mercúrio, apesar de proporcionarem baixos limites de detecção, não vêm sendo tão utilizados devido a sua toxicidade, dificultando seu manuseio.

Com isso, o desenvolvimento de novos métodos eletroanalíticos para a determinação de EE2 com o uso de um eletrodo não modificado torna-se interessante. Como descrito acima, Perez et al. desenvolveram um método utilizando o EDDB e a VOQ, contudo o uso de um sistema FIA pode diminuir ainda mais o LD e LQ além de, geralmente, fornecer melhor precisão e maior frequência analítica.

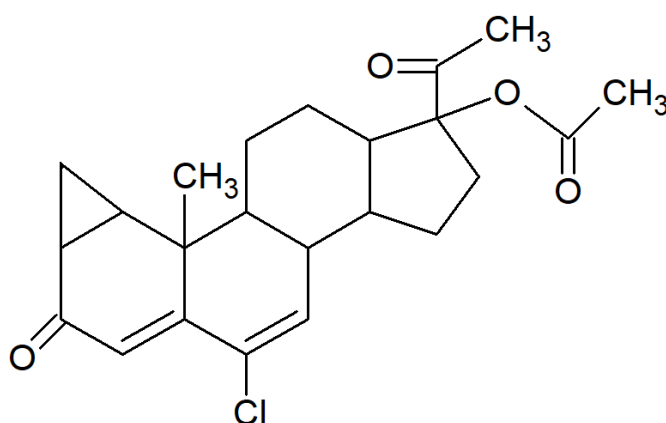
1.2 ACETATO DE CIPROTERONA: IMPORTÂNCIA E MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO

O Acetato de ciproterona (CPA) ([1S,2S,3S,5R,11R,12S,15R,16S)-15-acetyl-9-chloro-2,16-dimethyl-6-oxo-15-pentacyclo [9.7.0.02,8.03,5.012,16] octadeca-7,9-dieny l] acetate) (Figura 2) é um hormônio esteroide com propriedades anti-androgênicas e progestogênicas. É utilizado como fármaco no tratamento de câncer de próstata, hirsutismo, acne severa, hipersexualidade, puberdade precoce e terapias de reposição hormonal (GRUBER et al., 1998; HASSONVILLE et al., 2004; ELKS 2014; IBRAHIN et al., 2018; SOHRABI et al., 2010).

O CPA como fármaco pode ser comercializado sozinho ou combinado com outros hormônios, como por exemplo, o EE2 para o tratamento de distúrbios associados à androgenização, como o hirsutismo, e

acne em mulheres (BORGES et al., 2009; SPECK et al., 1976; GRUBER et al., 1998; CORRÊA et al., 2017).

Figura 2 – Estrutura molecular do hormônio CPA.



Fonte: O próprio autor

A absorção do CPA é completa por administração via oral e permanece quase 100% biodisponível. O CPA não é extensivamente hidrolisado e é eliminado quase que totalmente na sua forma inalterada, sendo aproximadamente 30% eliminado pela urina e 70% eliminado pela bile (IBRAHIN et al., 2018).

Conforme mostrado no Quadro 2 a solubilidade do CPA em água é baixa quando comparada a outros hormônios (em torno de $1,52 \text{ mg L}^{-1}$), além disso, o seu log de partição é igual a 3,81, o que indica hidrofobicidade da molécula de CPA, confirmando assim uma grande tendência em se bioacumular nos sedimentos e na biota, e um elevado poder de sorção (AURIOL et al., 2006).

Quadro 2 – Propriedades físico-químicas do CPA

Nome	MM (g mol ⁻¹)	Sw (mg L ⁻¹)	Log Kow
Acetato de ciproterona	416,94	1,52	3,81

Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04839>

MM: massa molar

Sw: solubilidade em água

Log Kow: logaritmo da constante de partição octanol/água

Mediante o exposto, o desenvolvimento de métodos analíticos para sua detecção e quantificação em amostras de medicamentos e amostras biológicas, como a urina, torna-se necessário. A maioria dos trabalhos descritos na literatura para a determinação do CPA empregam técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida, e espectrofotométrica.

Christiaens et al. (2004) desenvolveram um método automatizado para análise quantitativa de CPA em plasma humano utilizando a extração em fase sólida *on-line* (SPE) e a determinação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Para esse trabalho, foi utilizada uma coluna C18 e como fase móvel uma mistura de água, metanol e ácido fórmico (10:90:0,1 v/v/v). A faixa linear de concentração obtida foi de 0,00072 a 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um LQ de 0,00072 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método proposto foi utilizado em amostras de plasma humano e apresentou uma recuperação de $99 \pm 1\%$.

Hassonville et al. (2004) desenvolveram um procedimento simples e rápido utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para separar e quantificar o CPA em amostras da derme e epiderme, afim de estudar sua penetração transdérmica. A coluna usada foi a Lichrospher RP-18 e a fase móvel foi uma mistura de acetonitrila/água (40:60, v/v) com detecção UV em 282 nm. A faixa linear de concentração foi 0,080 a 1,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e os limites de detecção e quantificação foram de 0,02 e 0,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A metodologia desenvolvida foi utilizada para estimar a

penetração transdérmica da pomada contendo CPA na epiderme e na derme, em que obtiveram recuperações de 98 a 104% e 97 a 106%, respectivamente.

Souri e colaboradores (2005) empregaram a espectrofotometria derivada para a determinação simultânea de CPA e EE2 em amostras de medicamentos. As caracterizações foram realizadas em comprimentos de onda de 316 e 226 nm para CPA e EE2, respectivamente. O método proposto apresentou uma faixa linear de concentração de 12,0 a 144,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o CPA na presença de EE2 (840 $\mu\text{mol L}^{-1}$), em 316 nm. E uma faixa linear de concentração para o EE2 na presença de CPA (48,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de 0,00020 a 0,0011 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em 226 nm. O LD obtido foi de 12,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para o CPA e 0,00020 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para o EE2. O método proposto foi utilizado na análise de amostras de medicamentos e apresentaram erros menores do que 2%, indicando que não houve interferência de matriz e os resultados foram concordantes com o valor rotulado.

Markopoulou e Koundourellis (2006) desenvolveram um método para a determinação de três hormônios (etinilestradiol, acetato de ciproterona e norgestrel) em leite materno por CLAE com detector UV. A faixa linear de concentração para o CPA foi de 0,010 a 0,28 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com LD e LQ de 0,0024 e 0,010 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método desenvolvido foi utilizado em amostras de medicamentos nos quais se obteve uma recuperação de 94% para o CPA.

Na literatura foram encontrados apenas 2 trabalhos reportando o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação do CPA. El-Enany e colaboradores (2010) utilizaram as técnicas polarográficas de pulso diferencial (PPD) e de corrente direta (DC_t) para a determinação de CPA em amostras farmacêuticas sobre um eletrodo gotejante de mercúrio. A faixa linear de concentração obtida foi de 7,70 – 76,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a polarografia DC_t . E a faixa linear de concentração utilizando a PPD foi de 1,20 a 33,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um LD igual a 0,31 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método proposto foi empregado na análise de amostras farmacêuticas que obtiveram

recuperações entre 98,6 e 101,3% utilizando a polarografia de DC_t, e entre 98,9 e 100,9% utilizando a DDP.

Ibrahin et al. (2018) desenvolveram um sensor eletroquímico para a determinação de CPA utilizando nanotubos de carbono de múltiplas paredes carboxilatado (f-MWCNT) decorados com nanopartículas de ouro (AuNPs) e pasta de carbono vítreo (GCP) (AuNPs/f-MWCNT/GCPE). A faixa de concentração linear foi obtida entre 0,099 e 11,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com LD de 0,0166 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a VOQ. O procedimento desenvolvido foi utilizado na análise de amostras de urina e plasma humano com recuperações entre 98 e 101 % e, em amostras de medicamentos com recuperações entre 98 e 100%.

Os trabalhos reportados na literatura para a determinação do CPA utilizando as técnicas cromatográficas apresentam como vantagem a seletividade devido à separação prévia das substâncias na coluna cromatográfica. Porém, geralmente, necessitam de preparo de amostra mais complexo, uso de solventes orgânicos e maiores tempos de análise quando comparado às técnicas eletroanalíticas. Além disso, não é possível realizar a análise “*in situ*”.

Os trabalhos eletroanalíticos encontrados na literatura utilizam eletrodo de mercúrio e um eletrodo modificado, justificando assim, o desenvolvimento de um método eletroanalítico com o uso de um eletrodo sem modificação, que seja rápido, simples com bons limites de detecção e quantificação.

1.3 ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO

Os eletrodos a base de carbono amorfo, tais como, pasta de carbono, grafite pirolítico e carbono vítreo são muito utilizados como eletrodos de trabalho na eletroanalítica. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas formas de preparo do carbono tem chamado bastante atenção, sendo que, atualmente, um dos eletrodos de carbono mais

utilizados na eletroanalítica é eletrodo de diamante dopado com boro (KRAFT 2007; de BARROS et al., 2005)

O diamante é conhecido há mais de três mil anos, é um material atraente para diversas áreas de pesquisa devido às suas propriedades únicas como alta densidade atômica, dureza, capacidade de isolamento elétrico, alta condutividade e baixa constante dielétrica (PLESKOV, 2000; de BARROS et al., 2005). Devido a essas propriedades, houve o interesse dos cientistas pela síntese do diamante para que pudessem ser utilizados em maior escala e com menor custo.

Na década de 50, pesquisadores da empresa General Electric conseguiram transformar o grafite em diamante por meio de um método a altas pressões e temperatura (*High Pressure/High Temperature* – HPHT) que se assemelha ao processo natural de formação do diamante. Entretanto, esse método necessitava de instrumentações de alto custo, o que tornava inviável a produção em larga escala (PLESKOV, 2000; de BARROS et al., 2005).

Na mesma época, pesquisadores da Union Carbide conseguiram sintetizar os filmes de diamante por deposição química a vapor (*Chemical Vapor Deposition* – CVD) e este método mostrou-se com um menor custo para a produção em larga escala quando comparado ao método de HPHT. Devido à viabilidade econômica, a versatilidade e ao simples manuseio, o método por CVD é o mais utilizado para síntese dos filmes de diamante (PLESKOV, 2000; de BARROS et al., 2005).

O diamante puro é um isolante elétrico com um *gap* de energia em torno de 5 eV e não poderia ser usado como eletrodo, apesar de conduzir calor (PLESKOV, 2002; de BARROS et al., 2005; SHAMSA et al., 2008). Com o surgimento do diamante sintético, no ano de 1973, surgiram também os primeiros relatos do crescimento de filmes de diamante dopado com boro a baixas pressões a partir da mistura de B_2H_6/CH_4 usando grãos de diamante como substrato. Um filme de diamante quando é dopado apropriadamente adquire boa condutividade tornando-se um material promissor para ser

empregado como eletrodo (PLESKOV, 2002; de BARROS et al., 2005; SUSSMANN, 2009; CARVALHO, 2007; YANG et al., 2019).

O dopante mais conhecido é o boro, embora haja outros dopantes como o fósforo, nitrogênio e enxofre. A dopagem do filme deve ser realizada durante o seu crescimento, em que, geralmente o composto utilizado para essa dopagem é o trimetilboro que é adicionado à fase gasosa em uma concentração de 10 – 10000 ppm. Como o boro possui um elétron a menos na camada de valência do que o carbono, e tem um pequeno raio atômico, ele é facilmente introduzido no filme de diamante, este se comporta como um aceitador de elétrons, sendo o filme de diamante resultante efetivamente dopado com uma impureza aceitadora (boro) tornando-o um material semiconductor do tipo p (KRAFT 2007; ALFARO et al., 2006; PLESKOV, 2000; SALAZAR-BANDA et al., 2006; LIU et al., 2007; YANG et al., 2019).

O DDB ao ser utilizado como eletrodo de trabalho em células eletroquímicas apresenta inúmeras propriedades que o difere de outros eletrodos, como o carbono vítreo, o grafite pirolítico e pasta de carbono. Algumas das suas principais características são: estabilidade a corrosão em meios agressivos; baixa e estável corrente de fundo; estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas; estabilidade de resposta em longo prazo; boa resposta a alguns analitos em soluções aquosas e não aquosas com pré-tratamento convencional; fraca adsorção de moléculas polares e uma larga janela de potencial em meio aquoso que vai -1,5 a +2,5 V, aproximadamente. (de BARROS et al., 2005; YAGI et al., 1999; PEREIRA et al., 2012; SALAZAR-BANDA et al., 2006; PLESKOV, 2002; GRANGER e SWAIN 1999; YANG et al., 2019).

Algumas das propriedades do EDDB podem ser afetadas pela quantidade e pelo tipo de dopante, fatores morfológicos, defeitos no filme, presença de impurezas, orientação cristalográfica e terminação superficial (hidrogênio ou oxigênio) (SALAZAR-BANDA et al., 2006; YANG et al., 2019).

A superfície do filme do EDDB recém-preparado é hidrofóbica com terminação preferencialmente em hidrogênio, apresentam propriedades

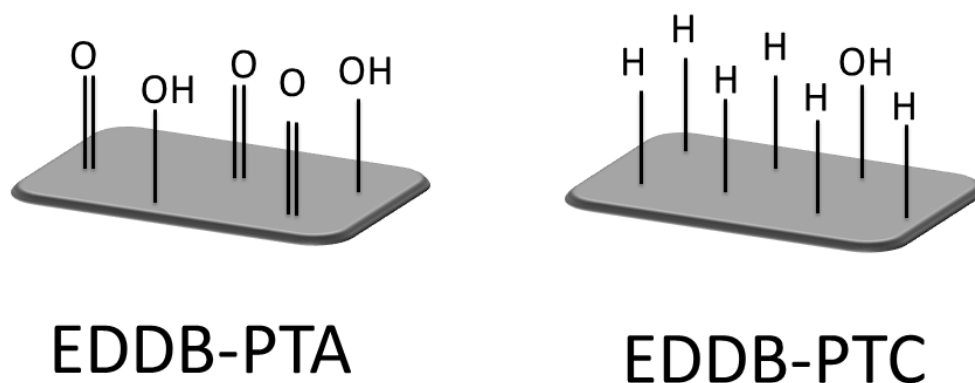
não polares, alta condutividade e baixa resistência à transferência de carga. Por outro lado, quando apresenta terminação superficial com grupamentos contendo, preferencialmente oxigênio, adquire características hidrofílicas, polares e condutividade elétrica mais baixa (PLESKOV, 2000; YAGI et al., 1999; SALAZAR-BANDA et al., 2006; SUSSMANN, 2009).

Geralmente, o EDDB, ao ser utilizado como eletrodo de trabalho em medidas eletroquímicas, é realizado pré-tratamentos em sua superfície, que podem ser químicos ou eletroquímicos, a fim de melhorar as respostas eletroquímicas, obtendo-se efeito eletrocatalítico, menor adsorção, etc.

O pré-tratamento eletroquímico superficial pode ser realizado a partir da aplicação de uma corrente (ou potencial) positiva (polarização anódica – PTA) ou negativa (polarização catódica – PTC). Quando o EDDB sofre polarização anódica, sua superfície adquire terminações com grupamentos preferencialmente contendo oxigênio devido às reações de oxidação da água; enquanto que, ao se carregar negativamente (polarização catódica), a superfície do eletrodo terá terminação preferencialmente em hidrogênio devido às reações de redução da água, como no esquema apresentado na Figura 3 (PLESKOV, 2000; SALAZAR-BANDA et al., 2006; HUPERT et al., 2003; YANG et al., 2019).

Alguns autores investigaram o mecanismo de transferência de carga e a cinética de alguns pares-redox no EDDB, sendo que os primeiros estudos sobre a influência da terminação superficial no comportamento deste foram publicados em 1999 em trabalhos desenvolvidos por Yagi et al. e Granger e Swain.

Figura 3 – Esquema ilustrativo das diferentes terminações superficiais do EDDB ao se realizar os pré-tratamentos anódico (PTA) e catódico (PTC) em sua superfície.



Fonte: O próprio autor.

Yagi et al. (1999) compararam os comportamentos eletroquímicos de um EDDB “*como recebido*” (terminação em hidrogênio) e após um tratamento com plasma de oxigênio. Os autores observaram que a transferência de elétrons dos pares redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ e $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$ se tornou mais lenta para o eletrodo tratado com plasma de oxigênio, enquanto que para o par redox $\text{Fe}^{3+/2+}$, a transferência eletrônica foi acelerada. Para os pares $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ e $\text{Co}(\text{em})_3^{3+/2+}$ não houve mudança. Esses resultados indicam que há uma diminuição na velocidade de transferência de carga para as espécies aniônicas quando se utiliza o eletrodo de DDB pré-tratado com plasma de oxigênio (terminação em oxigênio).

Em 2004, Suffredini et al. relataram o efeito do pré-tratamento eletroquímico (polarizações anódicas e catódicas) na superfície do EDDB para o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Observou-se um comportamento reversível no EDDB-PTC e, para o EDDB-PTA esse comportamento tornou-se quase-reversível. Na polarização catódica foi aplicado um potencial de -3,0 V por 30 minutos em uma solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . Os autores também relatam uma melhora significativa na resposta eletroquímica para clorofenóis, levando a uma diminuição dos LDs, indicando que a terminação superficial do EBDD pode ter grande influência sobre o seu desempenho analítico.

Com isso, observou-se que as respostas eletroquímicas do EDDB são extremamente dependentes da sua terminação superficial. Na literatura são encontrados diversos trabalhos nos quais os autores utilizaram o EDDB para a determinação de moléculas orgânicas que apresentaram melhores respostas eletroquímicas ao se utilizar o EDDB-PTC (MEDEIROS et al., 2012 a,b; GARBELLINI et al., 2015; SARTORI et al., 2017; EISELE et al., 2013; DEROCO et al., 2018; SALAMANCA-NETO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018; FALONE et al., 2019).

Alguns autores também relataram que o EDDB-PTC melhora a resposta eletroquímica para moléculas fenólicas quando se faz o pré-tratamento catódico devido à maior interação eletrostática molécula-eletrodo. Além disso, há um aumento na intensidade de corrente e definição de pico, repetibilidade e menor efeito de contaminação e incrustação na superfície do eletrodo (de FREITAS et al., 2019; TROUILLON et al., 2014; SUFFREDINI et al., 2004; DUARTE et al., 2016; YANG et al., 2019).

1.4 VOLTAMETRIA CÍCLICA, CRONOAMPEROMETRIA E SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica na qual o potencial aplicado ao eletrodo é variado continuamente com o tempo na forma de uma onda triangular, partindo de um potencial inicial (E_i) até um valor pré-determinado (E_v) e então quando este é alcançado, inverte-se o sentido da varredura até chegar ao potencial final (E_f), que pode ser o valor de E_i ou outro valor de interesse. Durante a varredura, o sinal registrado é a corrente gerada em função do potencial aplicado (PACHECO et al., 2013; SKOOG et al., 2009).

Atualmente, a VC é pouco empregada para a quantificação em procedimentos eletroanalíticos devido à existência de outras técnicas eletroquímicas mais sensíveis. Entretanto, é muito utilizada nos estudos de caracterização eletroquímica das espécies ou substâncias de interesse e do material utilizado como eletrodo de trabalho.

A cronoamperometria (CA) é outra técnica eletroquímica baseada na aplicação de um único degrau de potencial produzindo uma corrente que decai rapidamente com o tempo, em que o eletrodo de trabalho é mantido a um potencial constante no qual ocorre a oxidação ou redução eletroquímica das substâncias de interesse (dos SANTOS et al., 2011). A técnica amperométrica pode ser associada a um sistema de análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis – FIA*) e, neste caso, os sinais obtidos são baseados em picos de corrente em função do tempo pela aplicação de um potencial constante ao eletrodo de trabalho (dos SANTOS et al., 2011; LOURENCAO et al., 2017; LIMA et al., 2018).

O sistema FIA, proposto por Ruzicka e Hansen em 1975, é baseada na injeção de pequenas alíquotas de amostra em solução, dentro de um percurso analítico que contém um reagente adequado e, após a injeção, a amostra é transportada, por um fluxo carregador não segmentado, até o detector, no qual o sinal analítico é detectado e registrado (dos SANTOS et al., 2011).

Os parâmetros do sistema FIA, como volume da alça de amostragem e vazão da solução carregadora, podem ser otimizados a fim de se obter melhores respostas e sinal analítico para aumentar a sensibilidade do método. Essa técnica apresenta vantagens como rapidez, menor efeito de contaminação do eletrodo de trabalho, corrente capacitiva negligenciável, um baixo custo relativo dos componentes do sistema, alta frequência analítica e a possibilidade de automação (LOURENCAO et al., 2015; dos SANTOS et al., 2011; WONG et al., 2018).

Alguns trabalhos encontrados na literatura relataram o uso do EDDB com detecção amperométrica acoplado ao sistema FIA para a determinação de substâncias como pesticidas, hormônios, peróxido de hidrogênio, anti-hipertensivos, corantes alimentícios, antioxidantes, mostrando as vantagens na utilização deste sistema (STANKOVIC e KALCHER 2016; BROCENSCHI et al., 2014a; LOURENCAO et al., 2015; MOREIRA et al., 2018; DEROCO et al., 2018; MEDEIROS et al., 2012a; MEDEIROS et al., 2010; WONG et al., 2018).

Neste contexto, a associação de uma técnica eletroquímica simples, como a cronoamperometria, com as vantagens do sistema FIA e do EDDB se mostra bastante interessante para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a quantificação dos hormônios EE2 e CPA em amostras de medicamentos, ambientais e biológicas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação dos hormônios EE2 e CPA utilizando o EDDB e a técnica cronoamperométrica acoplado ao sistema FIA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o comportamento eletroquímico do EE2 e CPA por voltametria cíclica e cronoamperometria, como processos de oxidação e/ou redução que ocorrem na superfície do EDDB.

Estudar o comportamento eletroquímico do EE2 e CPA após diferentes pré-tratamentos eletroquímicos, anódicos e catódicos, no EDDB.

Desenvolver os métodos eletroanalíticos para a determinação do EE2 e CPA e obter as melhores condições analíticas.

Utilizar os métodos eletroanalíticos desenvolvidos na determinação do EE2 e CPA em amostras ambientais (água do lago Igapó), biológicas (urina sintética) e de medicamentos.

Avaliar a exatidão entre os métodos eletroanalíticos propostos e um método de referência no qual se utilizou a CLAE.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes usados nos experimentos foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas em água ultrapura em um sistema Milli-Q (Millipore®) com resistividade maior do que 18,2 MΩ cm.

O EE2 (98,0%) foi adquirido da Sigma-Aldrich e o CPA (99,0%) da Fagron. Os ácidos sulfúrico (99,9%), bórico (99,5%), fosfórico (85,0%), (99,8%), láctico e úrico, bem como sulfato de sódio (99,0%), fosfato monopotássico (99,0%), fosfato trissódico e dissódico, cloreto de sódio (99,0%), cloreto de cálcio hidratado, hidróxido de sódio (98,0%), álcool isopropílico (99,5%), ferrocianeto de potássio (99,9%) e acetona (99,9%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e da Merck.

Os medicamentos, de duas marcas diferentes, contendo EE2 na dosagem de 0,030 e 0,035 mg/comprimido e contendo CPA na dosagem de 50,0 mg/comprimido foram adquiridas em uma farmácia de Londrina, estado do Paraná, Brasil.

Para os estudos iniciais e estudo do melhor eletrólito suporte, foram utilizadas soluções de tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹, tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ (PBS) e soluções de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹.

A solução tampão BR pH 2,0 (0,04 mol L⁻¹) foi preparada pela dissolução de 1,236 g de ácido bórico, 1,14 mL de ácido fosfórico e 1,143 mL de ácido acético em um balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água ultrapura. Para o ajuste do pH foi adicionado NaOH 2,0 mol L⁻¹.

A solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ foi preparada a partir da diluição 2,70 mL de H₂SO₄ p.a. em um balão volumétrico de 100 mL. Quando necessário o uso de concentrações menores, fez-se a diluição desta.

A solução de hexacianoferrato (III) de potássio 0,1 mol L⁻¹ foi preparado a partir de 0,0329 g de K₃Fe(CN)₆ dissolvidos em 1,0 mL em água.

Soluções estoque de EE2 e CPA foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pela dissolução de 0,029641 g em etanol e 0,0417 g em acetona, respectivamente, em um eppendorf de 1,0 mL. Para o uso de concentrações menores, foram realizadas diluições em tampão BR (com 15 % etanol (v/v) para o EE2) a partir dessas soluções estoque.

Todas as vidrarias usadas passaram por um procedimento de limpeza com HNO_3 10 % (v/v) e posterior lavagem com água ultrapura a fim de eliminar a presença de resíduos que pudessem interferir nas medidas.

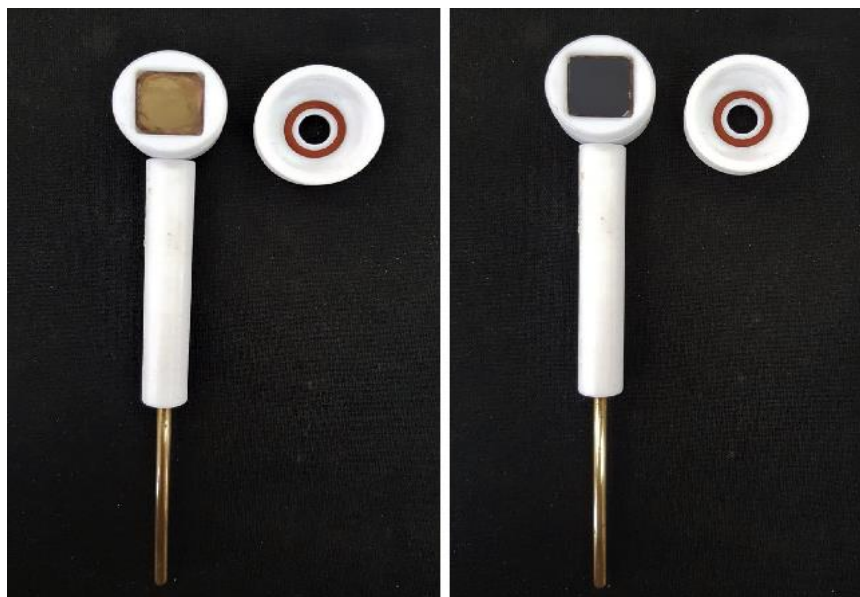
3.2 EQUIPAMENTOS

As pesagens foram feitas utilizando uma balança analítica Marte/Shimadzu modelo AY220 com precisão de $\pm 0,1 \text{ mg}$. As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando um pHmetro AZ86505 Bench Top Water. O banho de ultrassom utilizado foi um QUIMIS® modelo Q33502. Para as medidas voltamétricas e amperométricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato $\mu\text{AUTOLABIII/FRA2}$ interfaciado a um computador e gerenciado pelo software GPES.

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica de compartimento único com capacidade para 20,0 mL com três eletrodos: o eletrodo de trabalho utilizado foi o EDDB (área geométrica de $0,383 \text{ cm}^2$), como eletrodo de referência o Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e um fio de platina utilizado como eletrodo auxiliar. Na Figura 4 é mostrado um adaptador de Teflon® para o filme de DDB, o qual foi utilizado, na célula eletroquímica convencional, para a realização dos pré-tratamentos eletroquímicos.

O filme de DDB foi fabricado pela NeoCoat (Suíça), com um teor de boro de 8000 ppm sintetizado sobre um substrato de silício monocristalino dopado pela técnica de deposição de vapor químico por filamento aquecido (HF-CVD – *Hot Filament Chemical Vapor*).

Figura 4 - Adaptador para o eletrodo de trabalho (EDDB).

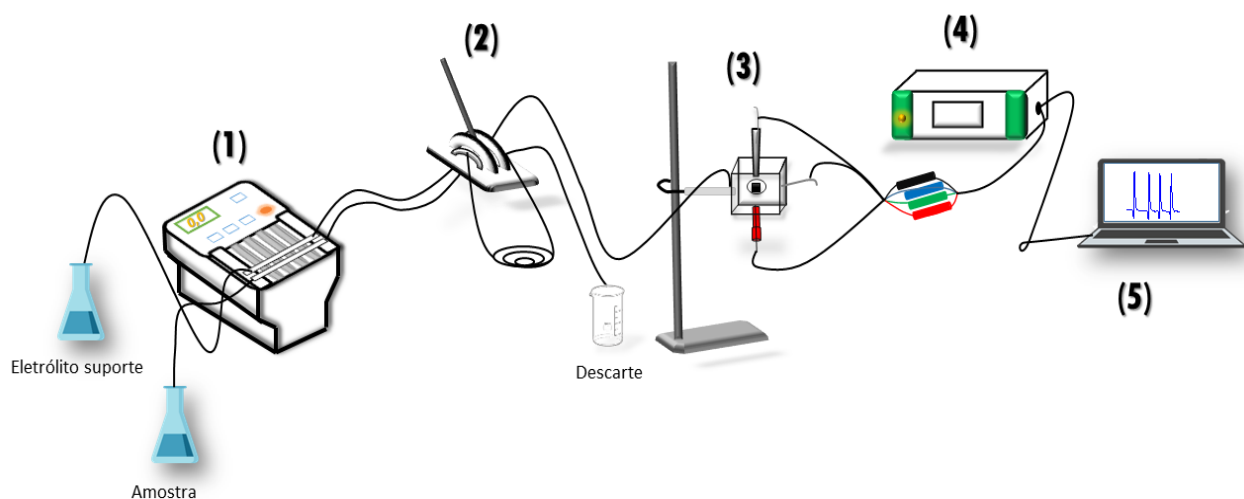


Fonte: O próprio autor.

Na Figura 5 é mostrado um esquema do sistema FIA utilizado acoplado à célula eletroquímica do tipo *wall-jet*/camada delgada. O sistema FIA foi constituído de uma linha única composta por um sistema propulsor, um injetor com alças de amostragens e linhas de condução de tubos de polietileno 0,8 mm de diâmetro interno. O sistema propulsor usado foi uma bomba peristáltica da marca Ismatec IPC. As amostras e soluções foram introduzidas em um sistema em fluxo utilizando um injetor manual construído em acrílico.

O funcionamento do sistema FIA consiste na passagem contínua de uma solução carregadora (ou eletrólito suporte) pela bomba peristáltica (1), passando pelo sistema injetor (2) até o eletrodo de trabalho (EDDB) (3) que foi conectado ao potenciostato/galvanostato (4), obtendo-se assim, sinais de corrente pelo tempo. Após a estabilização do sinal apresentado pela solução carregadora (contribuição apenas da corrente capacitiva), faz-se a injeção da amostra pelo sistema injetor (2) e, desta maneira, a amostra percorre a alça de amostragem chegando ao eletrodo de trabalho. As soluções carregadoras e as amostras são descartadas pelo tubo de aço inox, que também é utilizando como eletrodo auxiliar.

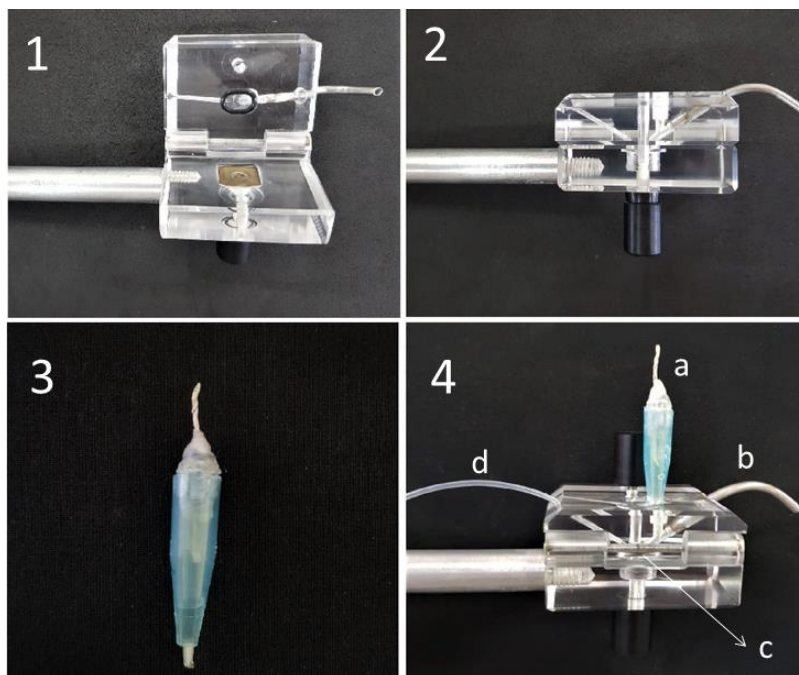
Figura 5 – Esquema do sistema FIA em linha única acoplada a célula eletroquímica. (1) bomba peristáltica; (2) injetor de amostra; (3) célula eletroquímica *wall-jet*/camada delgada; (4) potenciostato/galvanostato e (5) computador (sistema GPES).



Fonte: O próprio autor.

A célula eletroquímica utilizada no sistema FIA apresenta configuração *wall-jet*/camada delgada, em que o eletrodo de trabalho foi o EDDB, o eletrodo de referência foi um Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e o eletrodo auxiliar foi um tubo de aço inox, como mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Fotografia mostrando a célula eletroquímica *wall-jet*/camada delgada. 1 – adaptador *o-ring* para o encaixe do EDDB; 2 – célula fechada; 3 – eletrodo de referência; 4 – célula montada com (a) eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), (b) eletrodo auxiliar (tubo de aço inox) e descarte, (c) eletrodo de trabalho (EDDB) e (d) linha de condução do sistema FIA.



Fonte: O próprio autor.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AD/T LPGE KIT equipado com a um detector de arranjo de diodos (Tóquio, Japão) e uma coluna C18 (Phenomenex – 250 mm x 4,5 mm) com tamanho de partículas de 5 µm.

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A limpeza do EDDB foi realizada todos os dias, previamente ao uso, em banho ultrassom com álcool isopropílico por 5 minutos, seguido da limpeza com água ultrapura por mais 5 minutos.

O pré-tratamento eletroquímico foi realizado apenas no início do dia após a limpeza do EDDB e antecedendo as medidas realizadas para o

EE2 e para o CPA. Ambos os pré-tratamentos foram realizados em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, no pré-tratamento anódico (PTA) aplicou-se uma densidade de corrente de $+100 \text{ mA cm}^{-2}$ durante 30 s para condicionar e limpar o eletrodo, e em seguida, realizou-se o pré-tratamento catódico (PTC) aplicando-se -100 mA cm^{-2} durante 140 s a fim de obter um EDDB com terminação superficial preferencialmente em hidrogênio.

No desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos para a quantificação dos hormônios, EE2 e CPA, foi utilizada a técnica cronoamperométrica convencional. Inicialmente, foi estudado o melhor potencial de detecção para cada um dos hormônios. Os valores de potencial estudados para o EE2 foram de 0,8 a 1,25 V e para o CPA foram de 1,5 a 2,0 V. Em seguida, otimizou-se os parâmetros do sistema FIA: alça de amostragem, os valores estudados variaram entre 50,0 e 500,0 μL e vazão da bomba peristáltica cujos valores estudados foram de 0,60 a 4,40 mL min^{-1} , com o intuito de encontrar as melhores condições que proporcionassem alta frequência analítica.

Para a construção das curvas analíticas do EE2 e CPA, foram feitas sucessivas injeções ($N = 3$) das respectivas soluções em concentrações diferentes com o eletrólito suporte escolhido para cada hormônio. Foram obtidos amperogramas nos quais os sinais de corrente foram proporcionais às concentrações adicionadas. As curvas analíticas foram realizadas em triplicata.

O estudo de repetibilidade intra-dias foi realizado através injeções sequenciais ($N = 10$) de duas concentrações diferentes de EE2 ou CPA. E a repetibilidade entre-dias foi realizada através de injeções ($N = 3$) de duas concentrações diferentes de EE2 ou CPA em 5 dias diferentes.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações indicadas pela IUPAC:

$$\text{LD} = 3,3 \times \sigma/m \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{LQ} = 10 \times \sigma/m \quad (\text{Eq. 2})$$

Na qual, σ é desvio padrão de dez medidas da solução do branco dividido por m que é o coeficiente angular da curva analítica (LONG; WINEFORDNER, 1983).

O estudo de interferentes foi efetuado nas condições experimentais estabelecidas no desenvolvimento do método eletroanalítico. Os possíveis interferentes foram adicionados na razão de concentração de 1:1 (analito : interferente) separadamente e, na razão de concentração de 1:1 com todos os interferentes juntos. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos usando-se apenas a solução padrão do EE2 e ou CPA. Os compostos estudados como interferentes foram ácido úrico (AU), lactose (LAC) e ureia (U).

3.4 PREPARO DE AMOSTRAS

No preparo das amostras de formulações farmacêuticas, marcas A e B para o EE2 e marca A para o CPA, 10 comprimidos de cada formulação foram pesados e macerados em um graal com auxílio de um pistilo até a formação de um pó fino e homogêneo. A massa correspondente a 1 comprimido foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 10 mL contendo etanol (para o EE2) e acetona (para o CPA) e levado ao banho ultrassom por 10 minutos.

Para as amostras, alíquotas de 490 e 420 μL , marcas A e B para o EE2, respectivamente, foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e completados com o eletrólito suporte tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 (15 % etanol v/v), previamente à injeção de cada amostra no sistema em fluxo. Já para a amostra de marca A contendo CPA, uma alíquota de 750 μL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado com o melhor eletrólito de suporte que foi o tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 2,0).

As amostras de água do lago Igapó (Londrina – PR) foram coletadas em um frasco de plástico limpo e transparente, e foram armazenadas em geladeira a aproximadamente 4^o C. Posteriormente, foi filtrada em membrana e utilizada no preparo de uma solução de tampão BR

0,04 mol L⁻¹ (pH 2,0). Os experimentos foram feitos em triplicata, em que foram adicionadas alíquotas da solução padrão de EE2 às amostras. A partir dos sinais de corrente obtidos, foi possível realizar-se os testes de adição e recuperação nessas amostras.

O preparo da amostra de urina sintética foi realizado conforme descrito por Laube et al (2001) em que foram pesados 0,110 g de CaCl₂.2H₂O; 0,296 g de NaCl; 0,225 g de Na₂SO₄; 0,140 g de KH₂PO₄; 0,160 g de NH₄Cl e 2,5 g de ureia e foram dissolvidos em um balão volumétrico de 100 mL e completados com água ultrapura. Para o preparo das amostras de urina, 100 µL de urina sintética foi transferida para balões volumétricos de 10 mL e fortificadas com EE2 e CPA, individualmente, e completados com tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2,0). Desta maneira, foram quantificados EE2 e CPA nas amostras pelo teste de adição e recuperação.

Para as medidas utilizando-se a CLAE, foram pesados 10 comprimidos dos medicamentos, marcas A e B para o EE2 e marca A para o CPA, macerados e pesado a massa correspondente a 1 comprimido. Posteriormente, foram dissolvidos para 5,0 mL com a fase móvel metanol água (80:20 v/v) e foram filtradas previamente às injeções. Após o preparo das soluções, um volume de 20,0 µL foi injetado na coluna cromatográfica para a separação dos analitos e posterior detecção.

3.5 MÉTODO COMPARATIVO

Para ambos os hormônios (EE2 e CPA) o método comparativo utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV-vis. O procedimento descrito por Laban et al. (2004) com algumas modificações foi utilizado para a determinação de EE2 e CPA.

Uma coluna cromatográfica C18 foi utilizada como fase estacionária e como fase móvel foi utilizada uma mistura de metanol:água (80:20, v/v) com eluição no modo isocrático, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20,0 µL. O comprimento de onda selecionados no detector DAD foi de 220 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA ÁREA ELETROATIVA DO EDDB

Para estimar a área eletroativa do EDDB utilizou-se a Equação (3) de Randles-Sevcik: (WANG, 2006).

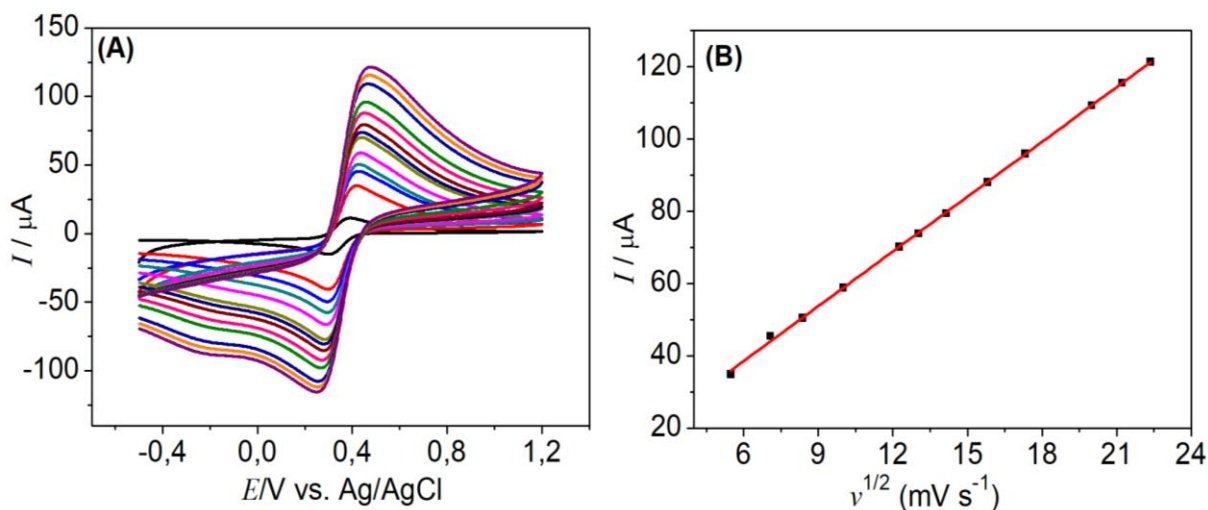
$$I_p / v^{1/2} = \pm (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C \quad (\text{Eq. 3})$$

Na qual A é a área eletroativa do eletrodo, em cm^2 ; $D^{1/2}$ é o coeficiente de difusão para o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ que é igual a $7,60 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; n é o número de elétrons envolvidos na reação para o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ que é igual a 1; $v^{1/2}$ é a raiz quadrada da velocidade de varredura (v) (mV s^{-1}); I_p é a corrente de pico (A) e C é a concentração de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$.

Na Figura 7 (A) são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial para o EDDB-PTC e, na Figura 7 (B) a relação linear entre I_p e $v^{1/2}$, cuja equação da regressão linear obtida foi: $y = 8,278 \times 10^{-6} + 5,054 \times 10^{-6} X$, ($R^2 = 0,999$). O coeficiente angular foi utilizado na Eq. 3 para o cálculo da área eletroativa do EDDB-PTC utilizado neste trabalho. A área geométrica do EDDB é de $0,385 \text{ cm}^2$ e a área eletroativa obtida foi de $0,383 \text{ cm}^2$.

Estudos realizados por Holt e colaboradores (2004) utilizando a microscopia de força atômica com ponta condutora e também a microscopia eletroquímica, mostraram que o EDDB possui uma superfície predominantemente isolante com pequenas áreas condutoras (menores do que $2,0 \mu\text{m}$ de diâmetro) e que são distribuídas randomicamente de maneira não uniforme sobre a superfície, por isso, mesmo com a rugosidade do filme sua área eletroativa não é maior que a geométrica.

Figura 7 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de potencial ($10 - 500 \text{ mV s}^{-1}$) utilizando um EDDB (área geométrica = $0,385 \text{ cm}^2$). **(B)** Relação linear obtida de I_p vs. $v^{1/2}$.



4.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO EE2 SOBRE O EDDB

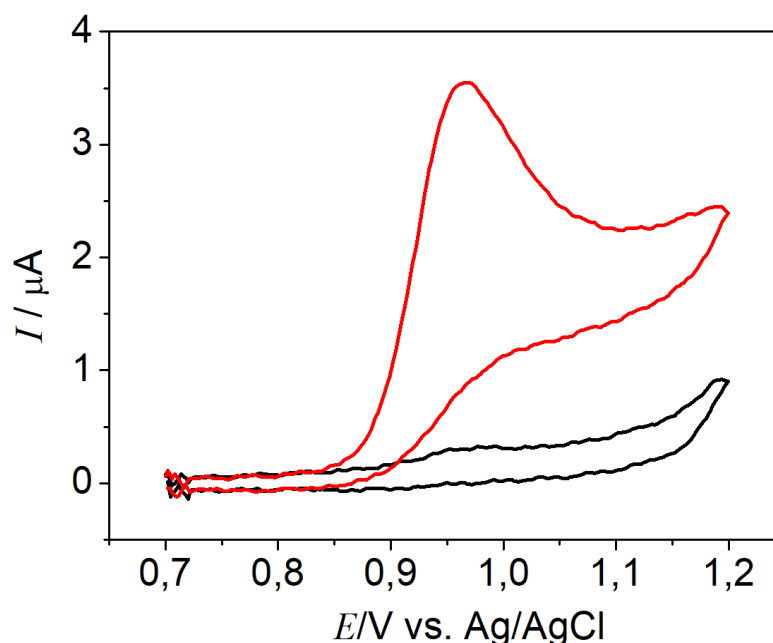
Utilizando a VC, foram realizados experimentos com o EDDB a fim de avaliar os processos de oxidação e/ou redução para o EE2 em solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (15 % etanol v/v). As medidas voltamétricas necessitaram de agitação da célula antecedendo cada medida realizada, em que a otimização do tempo de agitação foi de 1,15 minutos.

Foi realizada uma varredura na VC em toda a janela de potencial do EDDB (-1,5 a +2,5 V).

O voltamograma obtido com o EDDB, apresentado na Figura 8, mostrou que o EE2 apresenta um único pico de corrente anódico em aproximadamente, 0,97 V, ou seja, foi observado apenas um processo de oxidação. Não foi observado nenhum pico de corrente catódico (redução), o que indica um processo irreversível de oxidação do EE2. Esses resultados estão de acordo com trabalhos apresentados na literatura (SMAJADOR et al.,

2017; PEREZ et al., 2016; GHONEIM et al., 2006; LI 2007; PAVINATTO et al., 2015).

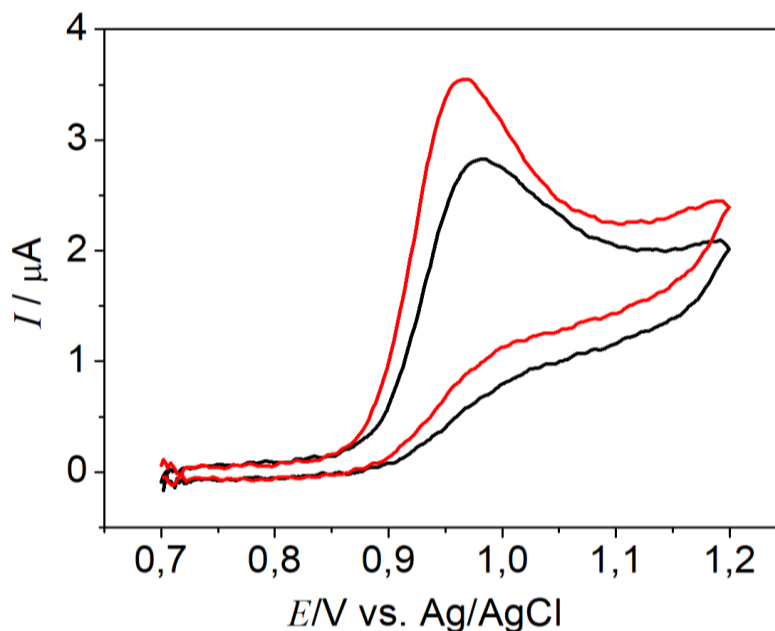
Figura 8 – Voltamograma cíclico obtido em solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 (15 % etanol v/v) na presença (—) de EE2 50,0 μmol L⁻¹ e na ausência (—) utilizando o EDDB-PTC. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



O efeito de dois diferentes pré-tratamentos eletroquímicos (descritos na sessão 3.3) sobre a superfície do EDDB também foram avaliados, a fim de obter melhor resposta eletroquímica para a determinação do EE2.

Na Figura 9 são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos com o EDDB pré-tratado anodicamente (EDDB-PTA) e com o EDDB pré-tratado catódicamente (EDDB-PTC) em solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 2,0) contendo EE2. Observou-se que houve uma melhora significativa na resposta eletroquímica para o EE2 com o EDDB-PTC, além de um pequeno deslocamento de potencial de oxidação para valores menos positivos e aumento da intensidade de corrente quando comparado ao EDDB-PTA.

Figura 9 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 (15 % etanol v/v) contendo EE2 50,0 μmol L⁻¹ utilizando o EDDB-PTA (—) e o EDDB-PTC (—). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



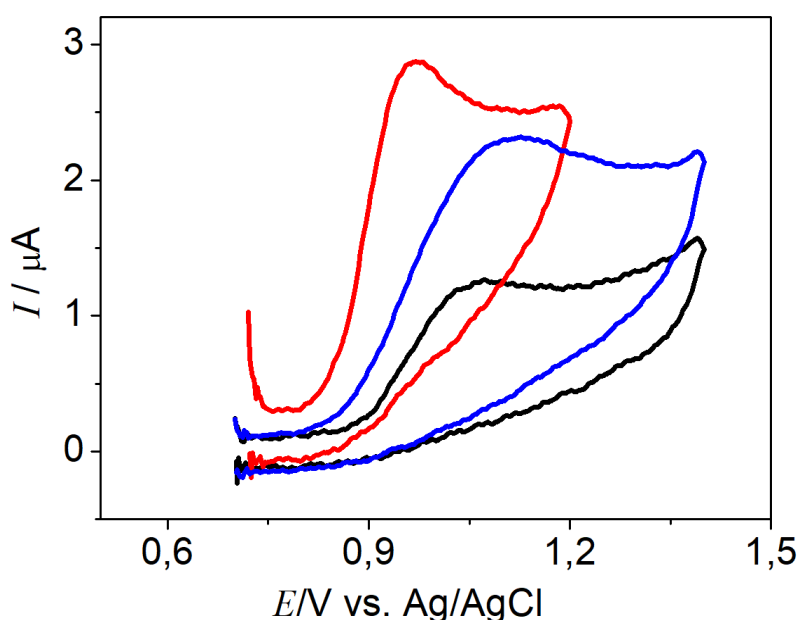
O EDDB quando pré-tratado catodicamente adquire características hidrofóbicas e o EE2, por possuir um alto valor de log K_{ow} e baixa solubilidade em água, também possui características hidrofóbicas. Assim, há uma maior facilidade de interação do EE2 com o EDDB-PTC. Esses resultados estão concordantes com os resultados apresentados em trabalhos encontrados na literatura, nos quais foram observados melhores desempenhos na determinação de hormônios estrógenos utilizando-se o EDDB-PTC (PEREZ et al., 2016; BROSCENCHI et al., 2014a,b; SANTOS et al., 2010).

4.2.1 EFEITO DO pH E ELETRÓLITO SUPORTE PARA A DETERMINAÇÃO DO EE2

O estudo de pH e do eletrólito suporte são importantes para o desenvolvimento do método analítico, pois possuem influência direta na resposta eletroquímica dos analitos.

Sendo assim, os eletrólitos suportes utilizados neste estudo foram H_2SO_4 , tampão fosfato e o tampão BR. Os voltamogramas obtidos com o EDDB-PTC em solução contendo EE2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Voltamogramas cíclicos obtidos para EE2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (—), tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (—), H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (—) utilizando o EDDB-PTC. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



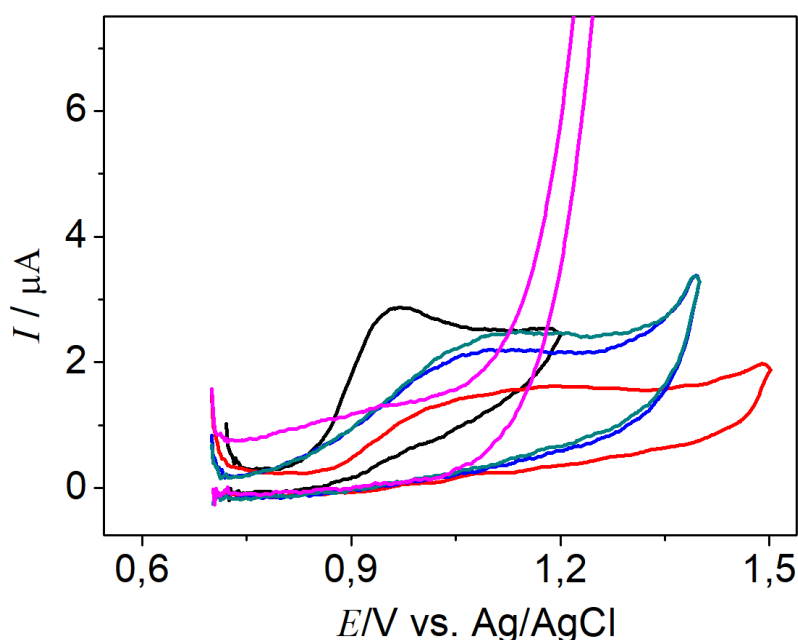
Analisando a Figura 10, o eletrólito suporte que apresentou melhor definição de pico e menor potencial de oxidação para o EE2 foi o tampão BR. Além disso, apresentou maior magnitude de corrente e menor desvio padrão relativo (DPR) entre as medidas ($< 1,0 \%$, $N = 3$) indicando uma melhor precisão na determinação do EE2.

A melhora na resposta eletroquímica obtida para ao EE2 com o tampão BR pode estar relacionada com o fato dos íons sulfato e fosfato apresentarem maior adsorção na superfície do eletrodo, influenciando no carregamento da dupla camada elétrica e, conseqüentemente, dificultando a

oxidação do EE2, o que leva a maiores potenciais de oxidação e menor magnitude corrente.

Após a escolha do eletrólito suporte, foi realizado um estudo da concentração hidrogeniônica do meio (pH). Os voltamogramas cíclicos obtidos são mostrados na Figura 11.

Figura 11 – Voltamogramas cíclicos obtidos para EE2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ nos pHs: 2,0 (—), 4,0 (—), 6,0 (—), 8,0 (—) e 10,0 (—) utilizando um EDDB-PTC. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



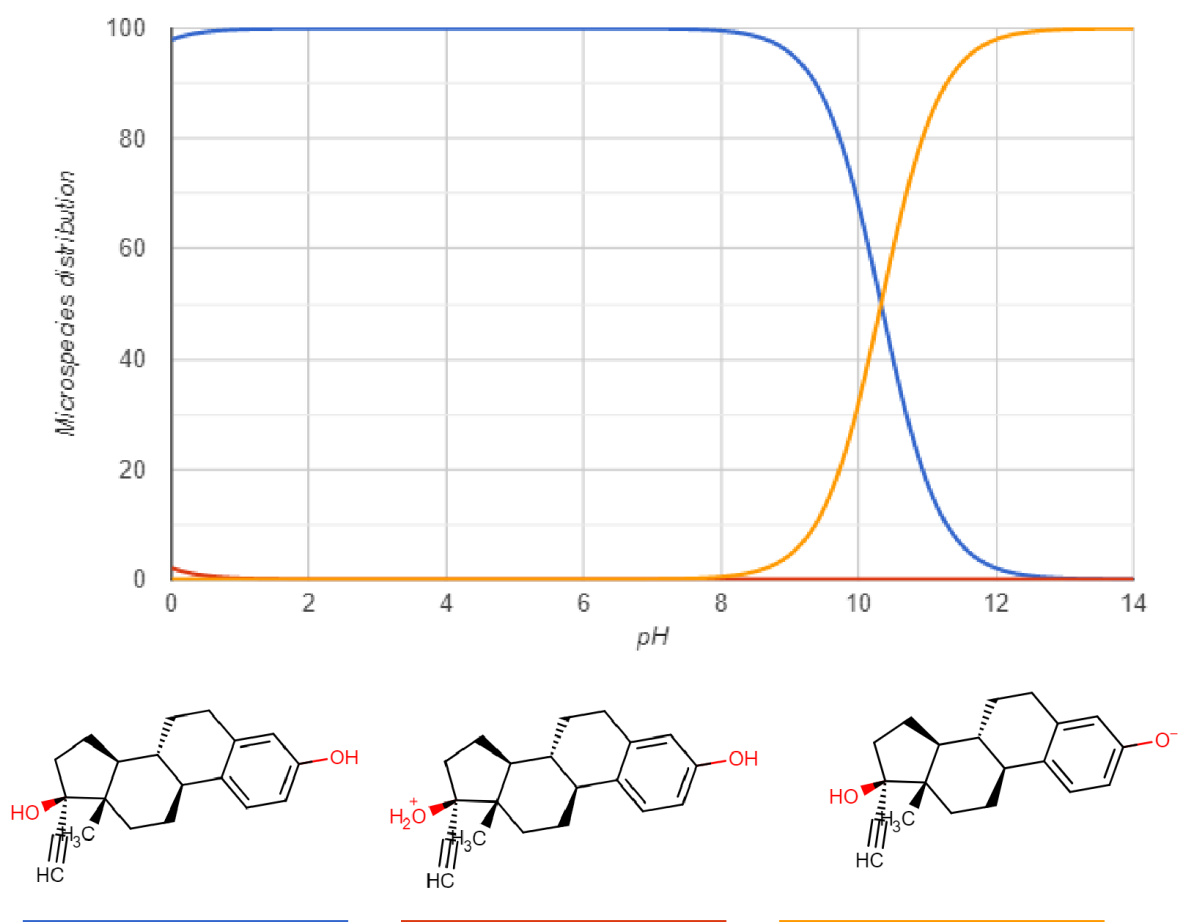
Ao analisar os voltamogramas, observou-se que com a elevação do pH ocorre uma diminuição significativa da magnitude corrente e, os picos de oxidação apresentam-se mais alargados. Sendo assim, o valor de pH selecionado foi 2,0 pois obteve melhor definição de pico, maior intensidade de corrente e menor DPR ($<1,0 \%$, $N = 3$) entre as medidas.

Em um trabalho publicado por Brocenschi et al. (2014c), para a determinação de estrona com o EDDB, os autores relataram que o valor da corrente de oxidação da estrona decai com o aumento do valor do pH, o mesmo aconteceu pra o EE2, neste trabalho. A estrona é um outro estrogênio de estrutura

química semelhante, que difere do EE2 apenas nos grupos funcionais ligados ao anel ciclopentano.

Na Figura 12 é mostrado um gráfico de distribuição das microespécies para o EE2 e sua relação com com o pH do meio.

Figura 12 – Gráfico de distribuição das microespécies para o EE2.



Fonte: www.chemicalize.com

O pKa do EE2 é igual a 10,4 como mostrado na Figura 12, logo, em pH 2,0 a molécula de EE2 estará neutra (sem carga). A melhor resposta voltamétrica foi obtida com o EDDB pré-tratado catodicamente (terminação preferencialmente em hidrogênio), mostrando uma melhor interação entre a molécula de EE2 neutra e o EDDB-PTC.

4.2.2 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

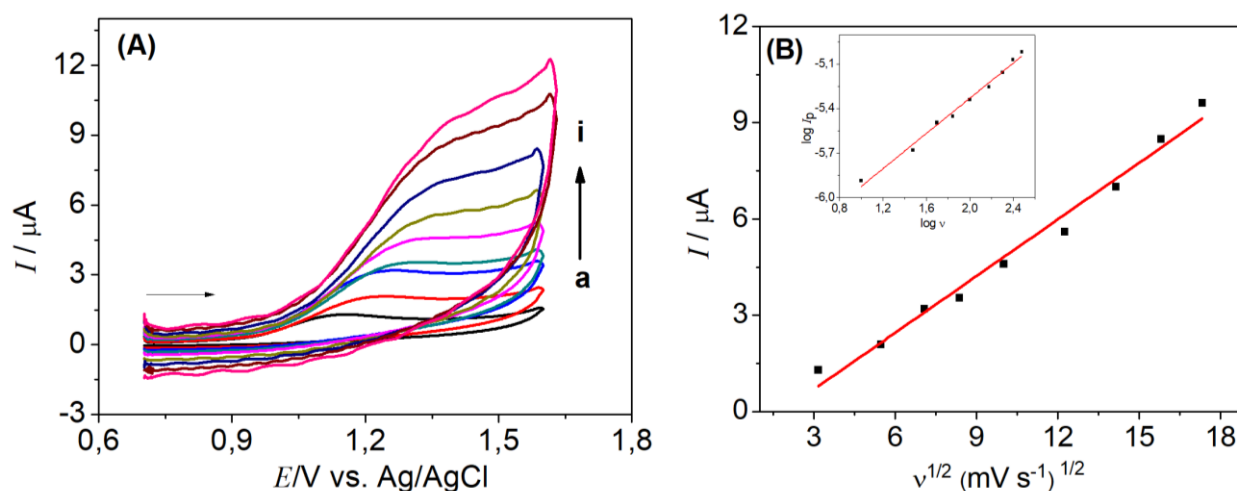
De acordo com a literatura, um dos parâmetros utilizados para identificar se o transporte de massa da reação é controlado por difusão ou adsorção das espécies à superfície eletródica é por meio do estudo da velocidade de varredura.

Na Figura 13 (A) são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 (15 % etanol v/v) para o EE2 em diferentes velocidades de varredura. Observou-se que com o aumento da velocidade de varredura, houve um aumento na magnitude do sinal de corrente e um deslocamento do potencial de oxidação do EE2 para valores mais positivos, sendo este comportamento característico de processos irreversíveis (DUARTE et al., 2014; GAN et al., 2013; VEGA et al., 2007; BARD e FAULKNER 2001; SMAJADOR et al., 2017; MARTINEZ et al., 2012; SILVA et al., 2015).

Pode-se observar também que a intensidade de corrente varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 13 (B)), descrita pela equação $I_{p_{EE2}} = - 1,0713 + 0,5884 v^{1/2}$, ($R^2 = 0,981$), indicando que o processo de oxidação é controlado preferencialmente por difusão das espécies eletroativas à superfície do eletrodo (FELIX et al., 2007; GAN et al., 2013; SJAMADOR et al., 2017; LORIMER et al., 2004; BARD e FAULKNER 2001).

Com os dados obtidos neste estudo e para confirmar o processo de difusão, construiu-se também um gráfico do logaritmo de I_p pelo logaritmo de v , como apresentado no gráfico inserido na Figura 13 (B). O coeficiente angular obtido pela equação da reta ($\log I_{p_{EE2}} = - 6,5208 + 0,5953 \log v$, ($R^2 = 0,989$)) de 0,5953 é muito próximo ao valor teórico descrito na literatura (0,5) para sistemas controlados por difusão das espécies (GOSSER 1993; SJAMADOR et al., 2017; GARCIA et al., 2007; GAN et al., 2013). Desta maneira, confirma-se que o processo de oxidação do EE2 é controlado preferencialmente por difusão das espécies à superfície do EDDB.

Figura 13 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para EE2 $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0, em diferentes velocidades de varredura: (a – i: 10, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300 mV s^{-1}) utilizando o EDDB-PTC. **(B)** Dependência de I_p vs. $v^{1/2}$ para EE2. O gráfico inserido corresponde à dependência de $\log I_p$ vs. $\log v$ para o EE2.



O coeficiente de difusão (D_0) para o EE2 foi calculado a partir da equação 4 [ANDRIEUX e SAVEANT 1978], onde F é a constante de Faraday ($9,6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$), A é a área geométrica do eletrodo ($0,385 \text{ cm}^2$), C_0 é a concentração do EE2 ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), R é a constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura (298 K), v é a velocidade de varredura (mV s^{-1}) e i é a corrente de pico (μA).

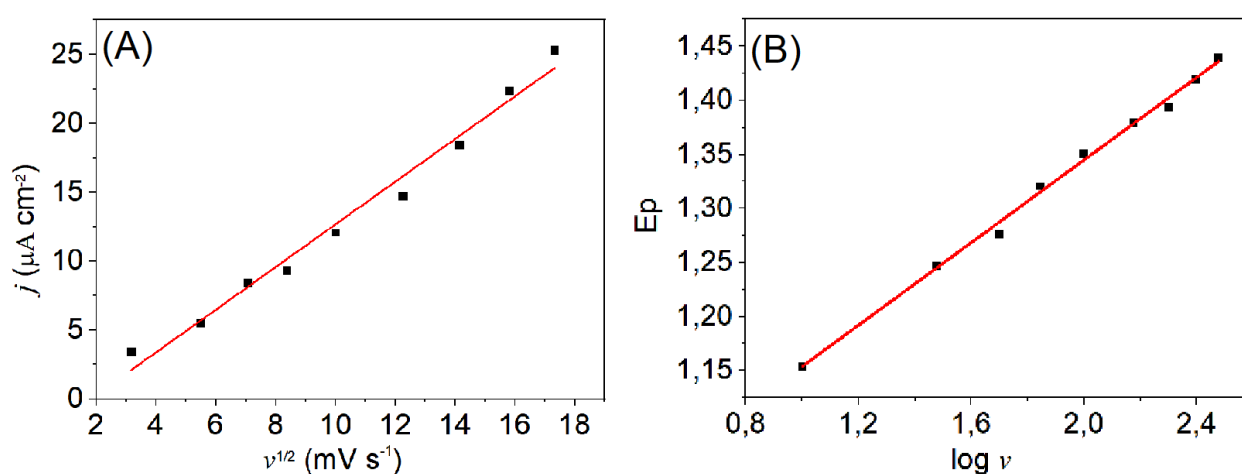
$$i = 0,496FAC_0D_0^{1/2}(F/RT)v^{1/2} \quad (\text{Eq. 4})$$

O valor obtido para o D_0 foi de $9,0 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Também foi possível estimar o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do EE2 usando a Equação 5 [WANG 2006; PLETCHER et al., 2011] e os dados obtidos do gráfico j vs. $v^{1/2}$ (Figura 14 (A)).

$$j = (2,99 \times 10^5)n(an_a)^{1/2}D_0^{1/2}C_0v^{1/2} \quad (\text{Eq. 5})$$

j é a densidade de corrente ($\mu\text{A cm}^2$), n representa o número de elétrons, α é o coeficiente de transferência de carga, n_a é o número de elétrons envolvidos na transferência de carga, D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C_0 é a concentração do EE2 ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e v é a velocidade de varredura (mV s^{-1}).

Figura 14 – Gráficos obtidos para (A) j vs. $v^{1/2}$ e (B) E_p vs. $\log v$.



Para estimar o valor de n , primeiramente foi necessário calcular o valor de αn_a que pode ser obtido a partir Equação 6 (BARD e FAULKNER 2001) e da relação linear obtida entre o potencial de pico anódico (E_p) e o $\log v$ ($E_p = 0,96248 + 0,19119 \log v$) como mostrado na Figura 14 (B).

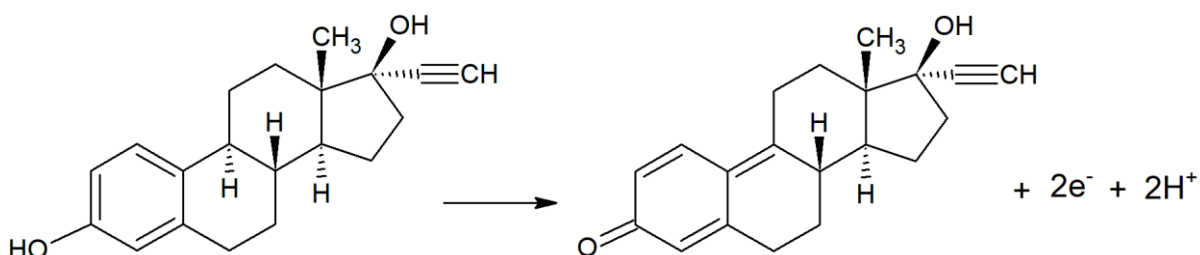
$$E_p = (1,15RT/\alpha n_a) \log v \quad (\text{Eq. 6})$$

O valor de αn_a obtido foi igual a 0,154. Por fim, usando a Equação 5 e o coeficiente de difusão foi possível estimar o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do EE2, cujo valor foi igual a 1,81, podendo ser aproximado para 2 elétrons (PEREZ et al., 2016; NUNES et al., 2016; Li 2007; VEGA et al., 2007).

Na Figura 15 é mostrado um possível mecanismo de oxidação com a transferência de 2 elétrons para o EE2 para hormônios estrógenos

apresentados mostrados em trabalhos encontrados na literatura (BROCENSCHI et al., 2014c; NGUNDI et al., 2003; PAVINATTO et al., 2015).

Figura 15 – Proposta de mecanismo para a reação de oxidação do EE2 na superfície do EDDB-PTC.



Fonte: O próprio autor (adaptado de PAVINATTO et al., 2015).

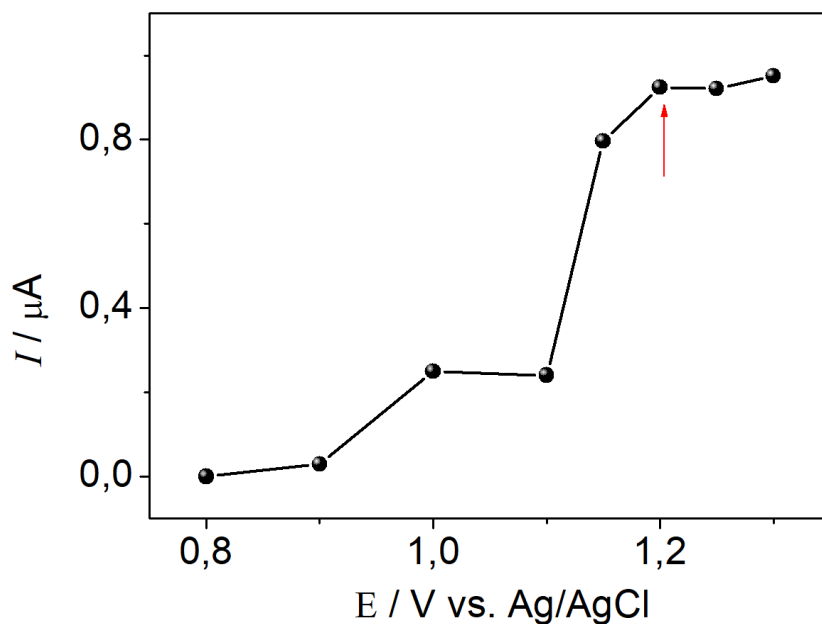
4.2.3 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DO EE2 EMPREGANDO O EDDB-PTC

4.2.3.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA CRONOAMPEROMÉTRICA E DO SISTEMA FIA

A técnica cronoamperométrica (CA) convencional acoplada ao sistema FIA foi utilizada para o desenvolvimento do método eletroanalítico para a determinação do EE2. As variáveis estudadas foram: potencial a ser aplicados para a oxidação do EE2, vazão da bomba peristáltica e volume da alça de amostragem.

Para o estudo do potencial de oxidação do EE2, foi construído o voltamograma hidrodinâmico (Figura 16) em potenciais que variaram de 0,8 a 1,25 V.

Figura 16 – Voltamograma hidrodinâmico obtido para EE2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (15 % etanol v/v) utilizando o EDDB-PTC. Volume da injeção = $450,0 \mu\text{L}$ e vazão = $3,20 \text{ mL min}^{-1}$ aplicando-se diferentes potenciais: 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,15; 1,20; 1,25 V.

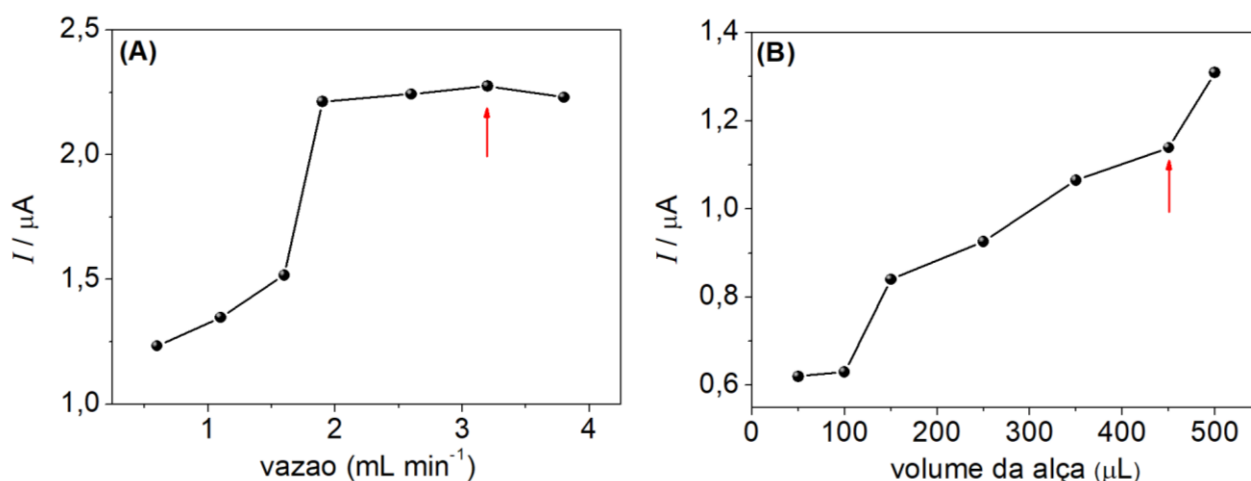


Diante dos resultados apresentados na Figura 16, observou-se que o sinal de corrente aumentou com o aumento da aplicação de potencial, e após o valor de 1,20 V houve uma estabilização na resposta. Sendo assim, o potencial escolhido para as medidas posteriores foi de 1,20 V, pois apresentou um bom sinal de corrente e um menor desvio padrão relativo entre as medidas ($< 1,0 \%$, $N = 3$).

Na VC, o máximo de corrente para a oxidação do EE2 foi obtida em aproximadamente 1,0 V (Figura 8), contudo, na CA o máximo de corrente foi obtido em 1,20 V. Esse comportamento pode ocorrer devido à diferença no modo de aplicação dos potenciais, em que na VC é realizada uma varredura de potencial a uma velocidade pré-estabelecida, enquanto que na CA, aplica-se um potencial constante durante todo o tempo de medida. Ademais, ao se utilizar o sistema FIA também há a contribuição da corrente convectiva proveniente da agitação da solução.

Para a otimização dos parâmetros do sistema FIA, os valores de vazão da solução carregadora (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0) estudados variaram de $0,60$ a $3,80 \text{ mL min}^{-1}$. Os sinais de corrente obtidos são apresentados na Figura 17 (A), em que se observou um aumento mais significativo no sinal de corrente até a vazão de $2,00 \text{ mL min}^{-1}$ seguido de um aumento mais ponderado até a $3,20 \text{ mL min}^{-1}$. Portanto, a vazão selecionada para os estudos posteriores foi o de $3,20 \text{ mL min}^{-1}$, pois apresentou boa definição de pico, maior magnitude de corrente e menor desvio padrão relativo ($< 1,0 \%$, $N = 3$) entre as medidas.

Figura 17 – (A) Magnitude da média ($N = 3$) dos sinais de corrente obtido na oxidação do EE2 $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função da vazão da solução carregadora (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (15 % etanol v/v), vazões: de $0,60$; $1,10$; $1,60$; $1,90$; $2,60$; $3,20$ e $3,80 \text{ mL min}^{-1}$. **(B)** Magnitude da média ($N = 3$) dos sinais de corrente obtido na oxidação do EE2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão BR pH 2,0 (15 % etanol v/v) em função do volume da alça de amostragem: 50 , 100 , 150 , 250 , 350 , 450 e $500,0 \mu\text{L}$ empregando-se o EDDB-PTC.



Na Figura 17 (B) são mostrados os sinais de corrente em função do volume da alça de amostragem. Observou-se que, à medida que se aumenta os volumes da alça de amostragem, há um aumento da magnitude de corrente devido

ao maior número de moléculas de EE2 que chegam à superfície do eletrodo e são oxidadas.

Volumes de alças de amostragem muito altos podem causar alargamento dos sinais de corrente obtidos, considerando que a solução do analito passa pela célula eletroquímica por um tempo maior, como foi observado com o volume da alça de 500,0 μL . Diante disso, foi escolhido o volume de 450,0 μL para alça de amostragem.

A Tabela 3 mostra os parâmetros que foram estudados e os valores selecionados para a determinação do EE2 após a otimização do sistema FIA, como descrito anteriormente.

Tabela 3 – Parâmetros estudados do sistema FIA para o EE2

Parâmetros	Valor estudado	Valor selecionado
Potencial (V)	0,8 – 1,25	1,2
Vazão (mL min^{-1})	0,60 – 3,80	3,20
Volume da alça (μL)	50,0 – 500,0	450,0

4.2.3.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E ESTUDO DE REPETIBILIDADE INTRA E ENTRE-DIAS

Após a seleção do melhor potencial a ser aplicado para a oxidação do EE2 e a otimização dos parâmetros do sistema FIA, foram realizados experimentos para a construção da curva analítica, nos quais soluções contendo EE2 em diferentes concentrações foram injetadas ao sistema em triplicata.

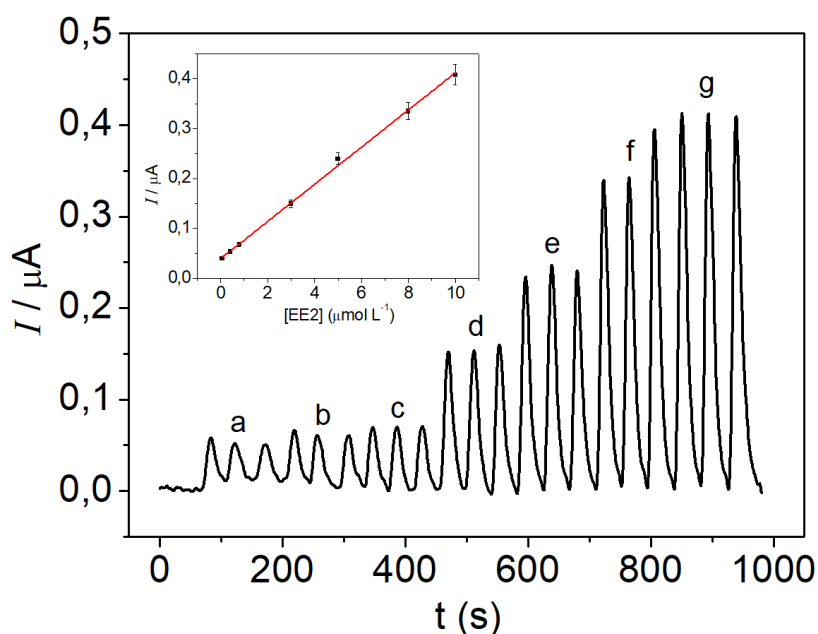
Por meio dos sinais de corrente obtidos no amperograma foi construída a curva analítica para o EE2 como mostrado no gráfico inserido na Figura 18.

A curva analítica apresentou boa linearidade e sua equação está apresentada na Equação 7:

$$I_{\text{EE2}} / \mu\text{A} = 0,03936 + 0,03727 [\text{EE2} (\mu\text{mol L}^{-1})] \quad (R^2 = 0,997) \quad (\text{Eq. 7})$$

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados foram $0,023 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,077 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 18 – Amperograma obtido utilizando o EDDB-PTC acoplado ao sistema FIA com a injeção de diferentes concentrações de EE2: (a – g): 0,07; 0,4; 0,8; 3,0; 5,0; 8,0 e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; potencial aplicado: 1,20 V (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (15 % etanol v/v). **Gráfico Inserido:** Curva analítica obtida para o EE2 no intervalo de concentração de 0,07 a $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Na Tabela 4 são apresentadas algumas condições analíticas obtidas por métodos eletroanalíticos para a determinação de EE2 de trabalhos encontrados na literatura e do método proposto.

O método proposto por Ghonein e colaboradores (2006) para a determinação do EE2 apresentou faixa linear de concentração e LD menores do que o obtido neste trabalho. Entretanto, os autores utilizaram como eletrodo de trabalho o eletrodo gotejante de mercúrio, que apresenta alta toxicidade dificultando seu manuseio.

Liu e colaboradores (2011), assim como nesse trabalho, empregaram a CA-FIA para determinação de EE2. Entretanto, os autores utilizaram eletrodos modificados que necessitam de um longo tempo de

preparo. Além disso, a faixa linear de concentração e o LD foram maiores do que os valores obtidos neste trabalho empregando o EDDB, que não necessita de modificação superficial.

Tabela 4 – Condições analíticas de métodos eletroanalíticos para a determinação do EE2 previamente reportado na literatura comparado ao método proposto

Técnica	Eletrodo	Intervalo linear de concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Características Analíticas	Referência
SWAdCSV ^a	Eletrodo de mercúrio	0,0019 – 0,60	0,0059	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de acumulação • Desoxigenação com nitrogênio 	(GHONEIM et al., 2006)
LSV ^b	Pasta de carbono	0,05 – 20,0	0,030	<ul style="list-style-type: none"> • Modificação de eletrodo • Uso de surfactantes • Tempo de acumulação 	(LI 2007)
CL-EC ^c	CNTs modificado com GCE	1,0 – 100	0,34	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de solventes orgânicos • Preparo de amostra 	(VEGA et al., 2007)
CA-FIA ^d	NiTTPS/MWNCT/GCE	0,2 – 60,0	0,12	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo para modificação • Complexos metálicos • Eletropolimerização 	(LIU et al., 2011)
VPD ^e	<i>Carbon Black</i> modificado com carbono vítreo	0,25 – 3,0	0,13	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo na modificação (~ 3 horas); • Etapa de pré-concentração. 	(SJAMADOR et al., 2017)
VOQ ^f	EDDB modificado com <i>carbon black</i> oxidado	0,005 – 0,10	0,009	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de modificação • Plasma de hidrogênio 	(GAN et al., 2013)

VOQ ^f	FTO-(Chi/CNTs) ₃	0,05 – 20,0	0,090	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de modificação 	(PAVINATTO et al., 2015)
VOQ ^f	MWCNT's/GCE	$1,02 \times 10^{-7} - 2,36 \times 10^{-4}$	$3,37 \times 10^{-8}$	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de modificação • Etapa de pré-concentração 	(MARTINEZ et al., 2012)
VOQ ^f	EDDB-PTC	0,99 – 5,2	0,24	<ul style="list-style-type: none"> • Sem necessidade de tratamento de amostra ou etapas de extração 	(PEREZ et al., 2016)
CA-FIA ^d	EDDB-PTC	0,070 – 10,0	0,023	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrodo sem modificação • Sem necessidade de tratamento de amostra ou etapas de extração • Alta frequência analítica • Uso de bomba peristáltica 	Este trabalho

^aSw-AdCSV = Voltametria adsorptiva de redissolução catódica por onda quadrada (Square Wave Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry)

^bLSV = Voltametria de varredura linear

^cCL-EC = Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas

^dCA-FIA = Cronoamperometria acoplada ao sistema FIA

^eVPD = Voltametria de pulso diferencial

^fVOQ = Voltametria de onda quadrada

Gan e colaboradores (2013) e Martinez e colaboradores (2012) obtiveram faixas lineares e LDs em menores concentrações do que o apresentado no método proposto. Contudo, foram utilizados eletrodos modificados que necessitam de um longo tempo de preparo, além de algumas especificidades que dificultam o preparo destes sensores, tais como: uso de plasma de hidrogênio a uma pressão de 60 mBar, a 600° C por 30 minutos, para produzir uma superfície hidrofóbica do eletrodo, imunoenensaio enzimático e dispositivo de papel.

O método proposto por Perez e colaboradores (2016) é simples comparado aos outros métodos, rápido e não há a necessidade de modificação de eletrodo. Os autores utilizaram a voltametria de onda quadrada (VOQ) e o EDDB-PTC para a determinação de EE2 em amostras de água de rio, com recuperações que variaram de 86,1 a 114,0%. Contudo, a faixa linear de concentração e os valores de LD e LQ obtidos pelos autores foram superiores aos valores obtidos neste trabalho. Além disso, ao utilizar-se o sistema FIA aumenta-se a frequência analítica do método, diminui-se o consumo de reagentes, diminui-se o erro aleatório ao utilizar alça de amostragem, pois apenas o volume referente ao volume da alça selecionado será introduzido no sistema. E há também a possibilidade de uma maior automatização do sistema.

Com isso, o método proposto utilizando o EDDB-PTC com detecção cronoamperométrica acoplado a um sistema FIA mostrou-se como uma alternativa eficaz para a determinação rápida do EE2 sem a necessidade de pré-concentração e modificação de eletrodo.

Ademais, não foi encontrado na literatura trabalhos que utilizem o EDDB-PTC com detecção amperométrica empregando-se o sistema FIA para a determinação de EE2.

Desta maneira, realizou-se o estudo de repetibilidade intra-dias e entre-dias. A repetibilidade intra-dias foi determinada por sucessivas medidas realizadas no mesmo dia (N = 10) de soluções contendo EE2 em duas concentrações diferentes. A repetibilidade entre-dias foi determinada por medidas realizadas em 5 dias diferentes (N = 5) com duas soluções de EE2

com concentrações diferentes. Os desvios padrões relativos (DPR) obtidos estão apresentados na Tabela 5. De acordo com os resultados obtidos, o método desenvolvido para a determinação do EE2 apresenta boa precisão, com DPR menores do 6,0%.

Tabela 5 – Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intra e entre-dias para o EE2

EE2 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Intra-dias DPR ^a (%)	Entre-dias DPR ^b (%)
0,08	5,4	3,3
0,50	2,5	3,8

^a(n=10); ^b(n=3)

4.2.3.3 DETERMINAÇÃO DO EE2 EM AMOSTRA DE MEDICAMENTO, ÁGUA DO LAGO IGAPÓ E URINA SINTÉTICA UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO.

Inicialmente foi avaliado o efeito de possíveis interferentes, geralmente encontrados na matriz das amostras analisadas para determinação do EE2.

As substâncias analisadas foram ácido úrico (AU), lactose (LAC) e ureia (U). Para avaliar se haveria a interferência das substâncias no sinal analítico, foi utilizada uma proporção de 1:1 (EE2:interferente) e também foi realizado um teste na presença de ácido úrico e ureia, pois ambos estão presentes na urina. Os resultados estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Erros relativos obtidos no estudo de interferentes para o EE2

Interferente	Erro Relativo (%)
Ácido Úrico	0,84
Lactose	4,80
Ureia	0,70
Ácido úrico:Ureia	0,68

Diante dos resultados obtidos, nota-se que os possíveis interferentes não causam alteração significativa na resposta eletroquímica para o EE2, visto que os erros relativos foram menores do que 5,0% para todas as amostras.

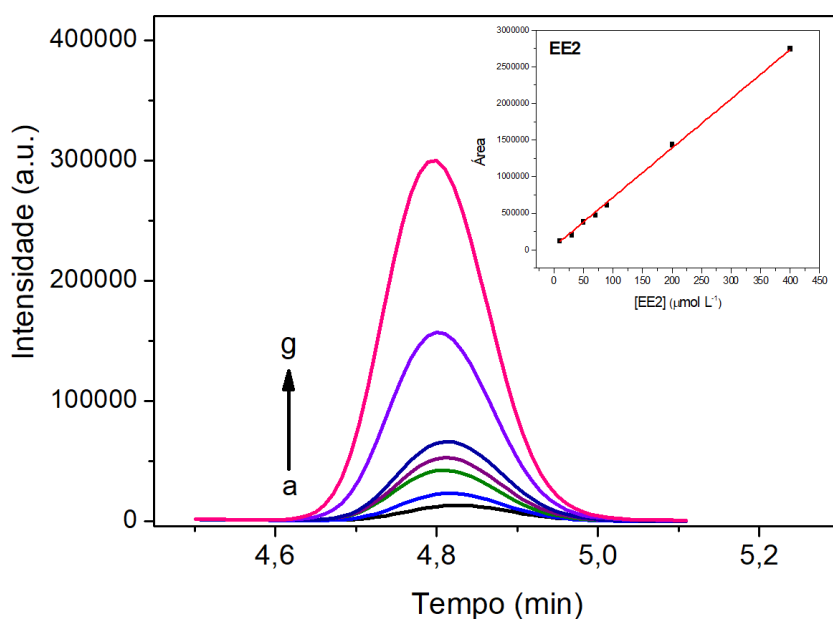
Em amostras ambientais e biológicas, como as amostras de águas e urina, pode haver a presença de outros hormônios estrogênicos, como o estradiol, estrona e estriol (BROCENSCHI et al. 2014a), todos esses se oxidam na mesma região de potencial do EE2, portanto, certamente irão interferir na determinação deste. Neste caso, seria possível realizar uma quantificação dos estrogênios totais e não apenas do EE2.

A CLAE foi utilizada como método comparativo ao método proposto na determinação de EE2 em amostras de medicamentos. Nas condições experimentais já descritas (seção 3.5), o EE2 apresentou tempo de retenção de 4,80 min. O cromatograma e a curva analítica estão apresentados na Figura 19.

A equação da curva analítica obtida para EE2 por CLAE foi:

$$A \text{ (a.u.)} = 18559,65 + 6851,36 [\text{EE2 } (\mu\text{mol L}^{-1})] \quad (R^2 = 0,998) \quad (\text{Eq. 8})$$

Figura 19 – Cromatogramas obtidos para o EE2 (a – g): 10, 30, 50, 70, 90, 200 e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($t = 4,80$ min; $\lambda = 220$ nm), fase móvel metanol/água (80:20 v/v) e vazão de $1,0$ mL min^{-1} . **Gráfico inserido:** Curva analítica obtida para o EE2 na faixa de concentração de 10 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



As dosagens de EE2 nos medicamentos marcas A e B, eram de 0,030 e 0,035 mg por comprimido, respectivamente. Ressalta-se que para o método proposto o preparo da amostra foi apenas a dissolução em etanol e, posterior diluição no eletrólito suporte, evidenciando a rapidez e viabilidade do método.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos pelo método proposto (CA) e o método comparativo (CLAE).

Tabela 7 – Resultados obtidos na determinação de EE2 em amostras de medicamentos usando o método proposto e o método cromatográfico

Amostra	Quantidade (mg comprimido ⁻¹) ^a			Erro (%) ^b
	Rotulado	CLAE	CA-FIA	
A	0,030	0,026 ± 0,002	0,028 ± 0,006	7,70
B	0,035	0,041 ± 0,003	0,039 ± 0,003	-5,13

^aMédia de 3 injeções.

^bErro (%) = $100 \times (\text{método CA-FIA} - \text{método CLAE}) / \text{método CLAE}$

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois métodos, aplicou-se o teste *t* de *student*. O valor de *t* calculado para as amostras A e B foram iguais a 0,56 e 0,85, respectivamente. Sendo o valor crítico de *t* tabelado igual a 2,78, considera-se que o método proposto empregando CA-FIA e o procedimento de referência empregando-se a CLAE não apresentaram diferenças significativas a um nível de confiança de 95%.

O método proposto também foi utilizado em estudos de adição e recuperação de EE2 em amostras de água do lago Igapó (Londrina – PR) e urina sintética. À essas amostras foram adicionadas duas concentrações diferentes de EE2, e os resultados das recuperações, de acordo com os sinais de corrente obtidos, estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos na determinação de EE2 em amostras ambientais e biológicas

Amostra	Adc. ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec. ^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Água	0,080	0,085 \pm 0,008	106
	0,50	0,47 \pm 0,03	94
Urina	0,080	0,083 \pm 0,004	104
	0,50	0,52 \pm 0,05	104

^aAdc.: Valor Adicionado

^bRec.: Valor Recuperado

Como pode ser observado na Tabela 8, as recuperações de EE2 nas amostras de água do lago Igapó foram de 106 e 94% e para a urina sintética ambas foram de 104%. Esses valores de recuperação indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na quantificação do EE2. Além disso, o método proposto pode ser utilizado na análise de amostras reais, ou seja, amostras que estejam realmente contaminadas com esse hormônio, no caso das amostras de água, ou que contenham o EE2, no caso das amostras de urina.

Desta maneira, o procedimento eletroanalítico desenvolvido se mostrou simples, rápido e eficiente para a determinação de EE2, com a

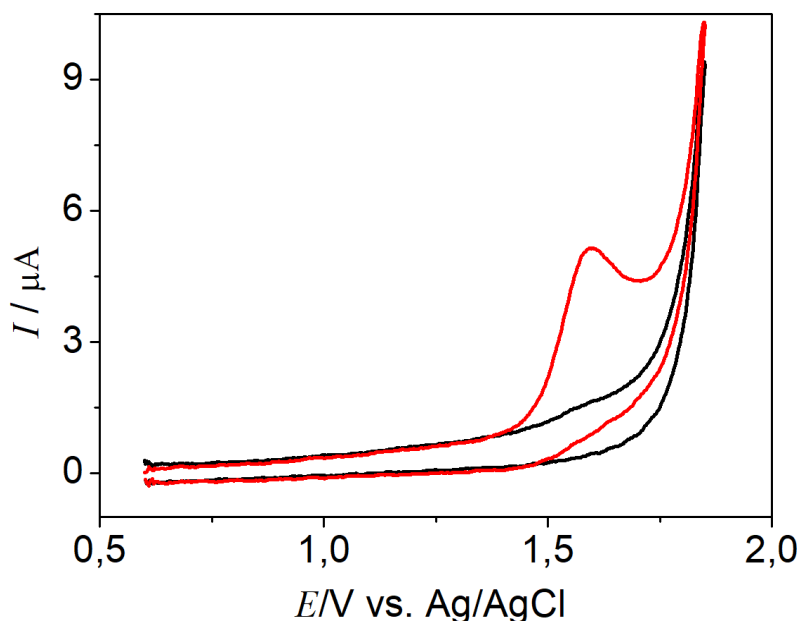
possibilidade de realizar-se a quantificação deste em amostras farmacêuticas, biológicas e ambientais considerando seu baixo LD e LQ. Ademais, apresentou vantagens como um menor consumo de reagentes, quando comparado a outras técnicas analíticas, e baixo tempo de análise com uma frequência analítica de 83 determinações por hora.

4.3 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO CPA SOBRE EDDB

A VC com o eletrodo de DDB em solução contendo CPA também foram empregados com o objetivo de se observar a presença de processos de oxidação ou de redução deste.

Na Figura 20 são apresentados os voltamograma obtidos apenas para o eletrólito suporte (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0) e para o CPA. Observou-se apenas um pico de corrente anódica em 1,60 V, não sendo observados picos de redução no sentido inverso de varredura de potencial. Isso indica um comportamento irreversível de oxidação deste hormônio. Esse mesmo comportamento eletroquímico do CPA foi mostrado no trabalho de El-Enany et al., (2010).

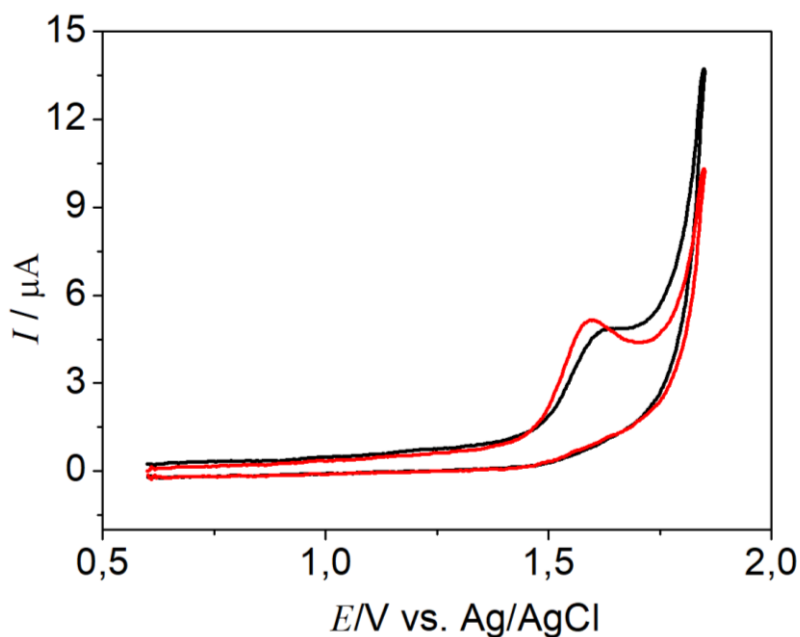
Figura 20 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 na presença (—) de CPA 50,0 μmol L⁻¹ e na ausência (—), utilizando o EDDB-PTC. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



O efeito dos pré-tratamentos eletroquímicos sobre EDDB no comportamento eletroquímico obtido para o CPA também foi avaliado. Os voltamogramas cíclicos obtidos com o EDDB-PTA e EDDB-PTC em solução contendo CPA são apresentados na Figura 21. Observou-se uma melhora na resposta eletroquímica para o CPA em termos de definição de pico, intensidade de corrente e ainda, um pequeno deslocamento no potencial de oxidação para um menor valor, quando o EDDB está pré-tratado catódicamente (PTC). Assim sendo, o EDDB-PTC foi escolhido para os estudos posteriores.

Como o CPA possui baixo valor de log P e baixa solubilidade em água (Quadro 2), a molécula de CPA apresenta características hidrofóbicas. E quando o EDDB é pré-tratado catódicamente (PTC), o eletrodo adquire características hidrofóbicas e terminação preferencialmente em hidrogênio. Portanto, o CPA possui uma melhor interação com o EDDB PTC.

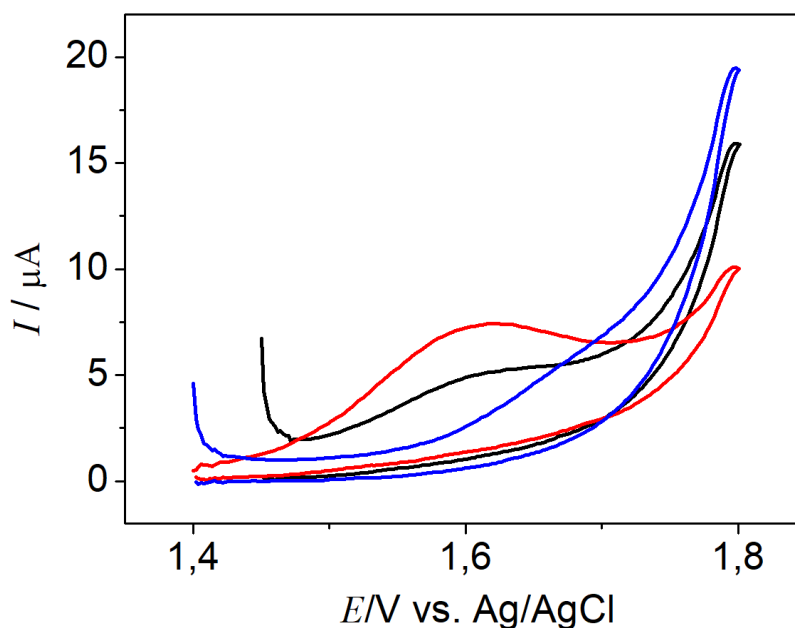
Figura 21 – Voltamogramas cíclicos obtidos para em solução de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 contendo CPA $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando e o EDDB-PTA (—) e o EDDB-PTC (—). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



4.3.1 EFEITO DO pH E ELETRÓLITO SUPORTE

O efeito do pH do meio e do eletrólito suporte também foram estudados devido a relação direta que possuem na resposta eletroquímica do analito. Assim como para o EE2, os eletrólitos suportes estudados para o CPA foram o tampão BR, tampão fosfato e H_2SO_4 . Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Voltamogramas cíclicos obtidos para CPA $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o EDDB-PTC em diferentes eletrólitos suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (—), tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (—) e H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (—) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

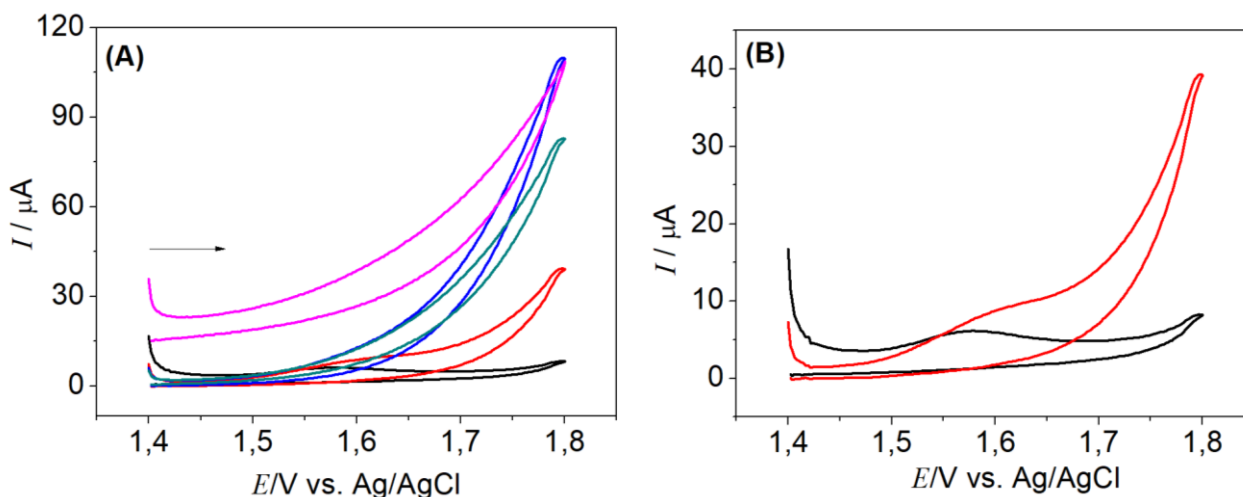


Desta maneira, o tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 foi selecionado como o melhor eletrólito suporte para os estudos posteriores. Tais resultados são concordantes com o comportamento obtido para o EE2.

O estudo da concentração hidrogeniônica (pH) do meio na resposta voltamétrica do CPA empregando o EDDB-PTC foi realizado em pHs de 2,0 a 10,0. Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 23.

Analisando os resultados, para pHs acima de 4,0 não foi observado o pico de oxidação do CPA e nota-se que houve um aumento significativo na corrente capacitiva. Ademais, os perfis voltamétricos obtidos em pHs acima de 2,0 indicam que o desprendimento de oxigênio (devido à oxidação da água) inicia-se em potenciais menores, o que pode dificultar a visualização do pico de oxidação do CPA.

Figura 23 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para CPA $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o EDDB-PTC em diferentes concentrações hidrogeniônicas do tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 (—), 4,0 (—), 6,0 (—), 8,0 (—) e 10,0 (—). (B) Voltamogramas em pH 2,0 (—) e 4,0 (—). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Em pH 4,0 nota-se pico de oxidação, porém com pouca definição e menor intensidade de corrente quando comparado ao obtido em pH 2,0. Desta maneira, o valor selecionado para os estudos posteriores foi de pH 2,0. Ibrahim e colaboradores (2018) também observaram que acima de pH 5,0 havia um decaimento da magnitude de corrente de pico (redução) para a molécula de CPA. Empregando-se eletrodo de nanotubos de carbono de múltiplas paredes (f-MWCNT) decorados com nanopartículas de ouro (AuNPs) e pasta de carbono vítreo (GCP) (AuNPs/f-MWCNT/GCPE).

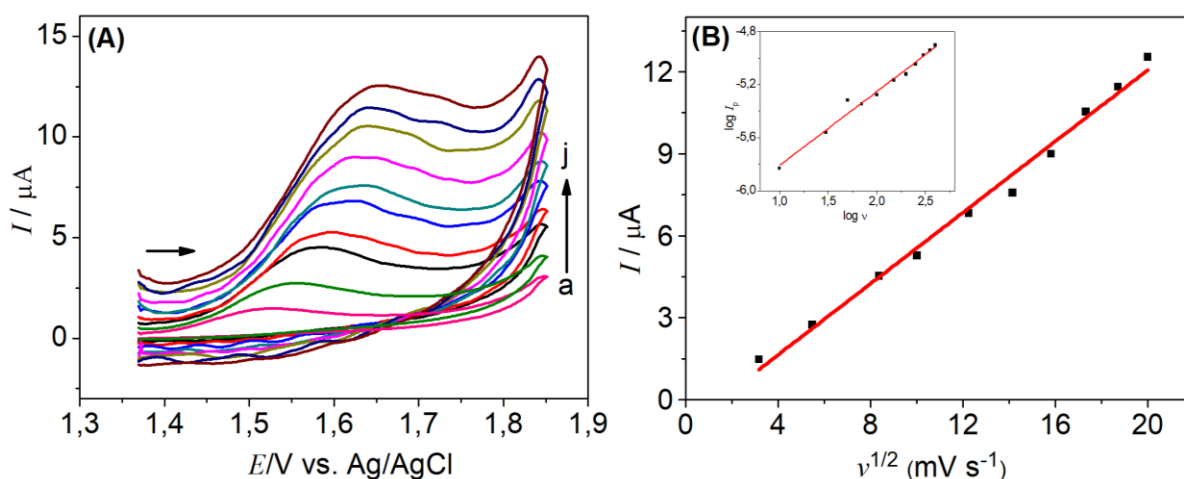
4.3.2 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

No estudo do efeito da velocidade de varredura, voltamogramas cíclicos foram obtidos em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 para o CPA em diferentes ν : $10 - 400 \text{ mV s}^{-1}$.

Como mostrado na Figura 24 (A), conforme aumenta-se ν , tem-se um aumento na intensidade de corrente e um deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos, indicando a irreversibilidade do processo eletroquímico

da oxidação do CPA sobre o EDDB-PTC (GAN et al 2013; VEGA et al 2007; BARD e FAULKNER 2001; SMAJADOR et al 2017; MARTINEZ et al 2012).

Figura 24 – (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0 contendo CPA 100,0 μmol L⁻¹ utilizando o EDDB-PTC em diferentes velocidades de varredura (a – j: 10, 30, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 mV s⁻¹). **(B)** Dependência I_p vs. $v^{1/2}$ para o CPA. O gráfico inserido corresponde à dependência do $\log I_p$ vs. $\log v$ para o CPA.



Na Figura 24 (B) é mostrada relação linear ($I_{p_{\text{CPA}}} = - 0,9563 + 0,6509 v^{1/2}$, $R^2 = 0,989$) obtida entre as correntes (I_p) máximas da oxidação do CPA com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Esse comportamento indica que o transporte de massa é controlado por difusão das moléculas de CPA à superfície do eletrodo (IBRAHIN et al., 2018; FELIX et al 2007; GAN et al 2013; KRISHNAMOORTHY et al 2018; JOTHI et al 2018).

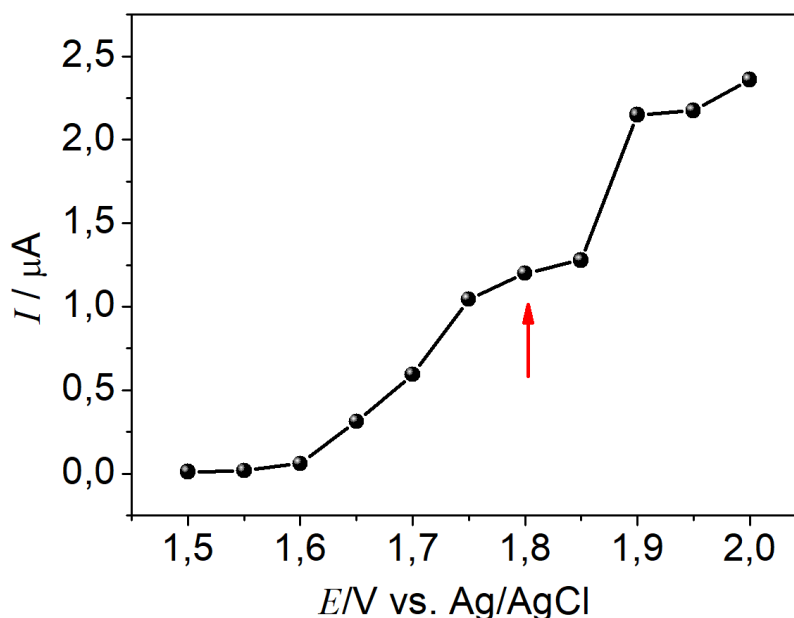
No gráfico inserido na Figura 24 (B) é apresenta a relação linear entre o $\log I_p$ e o $\log v$ que é dada pela equação: $\log I_{\text{CPA}} = - 6,36593 + 0,55701 \log v$, ($R^2 = 0,980$), onde que o coeficiente angular de 0,557, é muito próximo ao valor de 0,50 previsto na literatura para sistemas que são controlados por difusão das espécies (IBRAHIN et al., 2018; GOSSER 1993; SJAMADOR et al 2017; GARCIA et al 2007; GAN et al 2013). Desta maneira, confirma-se que o processo de oxidação do CPA é controlado preferencialmente por difusão das espécies à superfície do EDDB.

4.3.3 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DO CPA EMPREGANDO O EDDB-PTC

4.3.3.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA CRONOAMPEROMÉTRICA E DO SISTEMA FIA

Para o estudo do melhor potencial a ser aplicado para a oxidação do CPA, foram realizadas medidas amperométricas variando-se os potenciais de 1,50 a 2,0 V para a obtenção do voltamograma hidrodinâmico, como mostrado na Figura 25.

Figura 25 – Voltamograma hidrodinâmico obtido para CPA 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0 utilizando o EDDB-PTC. Volume de injeção = 150,0 μL e vazão = 2,30 mL min^{-1} aplicando-se diferentes potenciais: 1,50; 1,60; 1,65; 1,70; 1,75; 1,80; 1,85; 1,90; 1,95 e 2,0 V.



Analisando a Figura 25, observou-se que em potenciais menores do que 1,60 V praticamente não se obtêm corrente faradaica, e após esse potencial, as correntes aumentam significativamente até 1,75 V. Nos

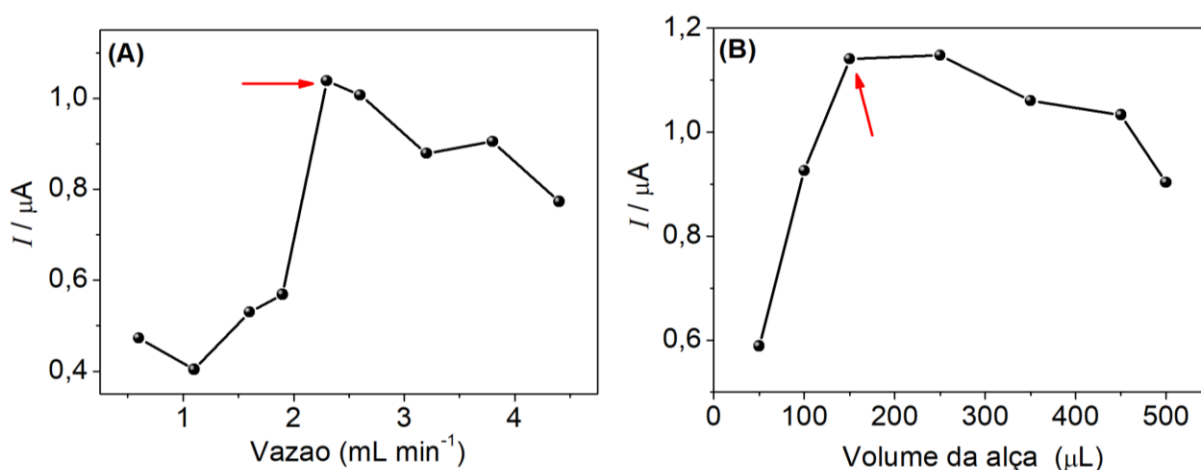
potenciais seguintes, a corrente aumenta ponderadamente até 1,90 V, seguida de um aumento mais acentuado em potenciais maiores, o que pode estar relacionado com a reação de oxidação da água que contribui para um aumento na intensidade de corrente. Diante disso, o potencial de 1,80 V foi selecionado para os estudos posteriores, pois apresentou boa intensidade de corrente e menor alargamento de pico.

Quando se utilizou a VC para avaliar o comportamento eletroquímico do CPA (Figura 20), foi observado o máximo de corrente para a oxidação em aproximadamente 1,60 V, enquanto que, quando se empregou a CA, a melhor resposta foi obtida em 1,80 V. Esse comportamento pode ser explicado devido à diferença no modo de aplicação dos potenciais entre as técnicas, pois na VC é realizada uma varredura de potencial a uma velocidade pré-estabelecida, enquanto que, na CA, aplica-se um potencial constante durante todo o tempo da medida. Além disso, ao se utilizar a CA acoplada ao sistema FIA, há a contribuição da corrente convectiva proveniente da agitação da solução. Esse mesmo comportamento também foi observado para o EE2, como descrito anteriormente.

Assim sendo, para obter melhores condições analíticas para a quantificação do CPA, os parâmetros do sistema FIA otimizados foram: vazão da bomba peristáltica e volume da alça de amostragem.

Na Figura 26 (A) são apresentados os sinais de corrente para a oxidação da CPA em função das diferentes vazões estudadas. Observou-se que os sinais de corrente aumentaram com aumento da vazão até 2,30 mL min⁻¹ e, em vazões maiores, houve uma diminuição dos mesmos. Esse comportamento pode estar associado a uma maior remoção das espécies de CPA que chegam à superfície do eletrodo, devido à alta vazão, antes mesmo das moléculas se oxidarem, e assim, os sinais de corrente decaem (LIMA, 2016; SVORC e KALCHER 2014). Desta maneira, a vazão escolhida para os estudos posteriores foi de 2,30 mL min⁻¹.

Figura 26 – (A) Magnitude da média (N = 3) dos sinais de corrente obtido na oxidação do CPA $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função da vazão da solução carregadora (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0) em vazões de: 0,60; 1,10; 1,60; 1,90; 2,30; 2,60; 3,60; 3,20, 3,80 e 4,40 mL min^{-1} **(B)** Magnitude da média (N = 3) dos sinais de corrente obtido na oxidação do CPA $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 em função do volume da alça de amostragem: 50, 100, 150, 250, 350, 450 e 500,0 μL empregando o EDDB-PTC.



Na Figura 26 (B) são mostrados os resultados para o efeito do volume da alça de amostragem nos sinais de corrente obtidos pela oxidação do CPA. Observou-se um aumento dos sinais de corrente com o aumento do volume da alça de amostragem até 150,0 μL , e após 250,0 μL há um decaimento das respostas obtidas. Esse comportamento ocorre devido à amostra sofrer uma dispersão longitudinal do centro da amostra, ou seja, a amostra é diluída ao longo do percurso analítico. Desta maneira, o aumento do volume da alça de amostragem faz com que a dispersão diminua no centro da amostra e a magnitude de corrente aumente até atingir um limite onde o centro da amostra não sofrerá mais dispersão com o volume injetado.

Perante os resultados, o volume da alça de amostragem selecionado para os estudos posteriores foi o de 150,0 μL , pois apresentou

maior intensidade de corrente e, menor DPR (< 1,0 %, N = 3) entre as medidas.

A Tabela 9 mostra os parâmetros que foram estudados e os valores selecionados para os estudos posteriores após a otimização do sistema FIA para a determinação do CPA.

Tabela 9 – Parâmetros do sistema FIA

Parâmetros	Valor estudado	Valor selecionado
Potencial (V)	1,55 – 2,0	1,80
Vazão (mL min ⁻¹)	0,60 – 4,40	2,30
Volume da alça (µL)	50,0 – 500,0	150,0

4.3.3.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA E ESTUDOS DE REPETIBILIDADE INTRA E ENTRE-DIAS

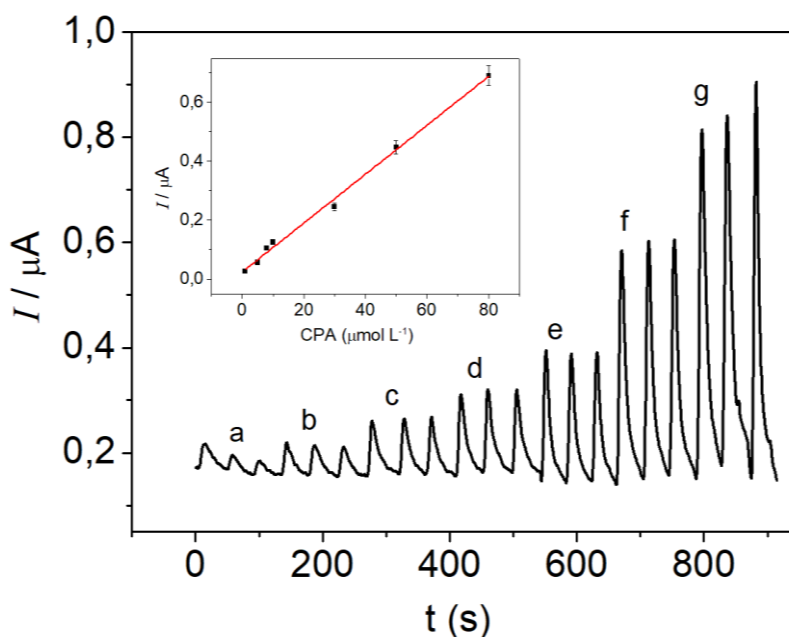
Após a seleção do melhor potencial de oxidação para o CPA e a otimização dos parâmetros do sistema FIA, foram realizados experimentos para a construção da curva analítica, nos quais soluções contendo CPA em diferentes concentrações foram injetadas ao sistema em triplicata. Na figura 26 é apresentado o amperograma obtido.

Por meio dos sinais de corrente obtidos no amperograma, foi construída a curva analítica para o CPA como mostrado no gráfico inserido na Figura 27. A curva analítica apresentou linearidade na faixa de concentração de 1,0 e 80,0 µmol L⁻¹ e sua equação está apresentada na Equação 9:

$$I_{CPA} / \mu A = 0,02419 + 0,00831 [CPA (\mu mol L^{-1})] \quad (R^2 = 0,995) \quad (Eq. 9)$$

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados a partir das Equações 1 e 2, foram de 0,23 e 0,75 µmol L⁻¹, respectivamente.

Figura 27 – Amperograma obtido utilizando o EDDB-PTC acoplado ao sistema FIA com a injeção de diferentes concentrações de CPA (a – g): 1,0; 5,0; 8,0; 10,0; 30,0; 50,0 e 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado: 1,80 V (tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0). **Gráfico Inserido:** Curva analítica obtida para o CPA no intervalo de concentração de 1,0 a 80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Na Tabela 10 são apresentadas algumas condições analíticas de trabalhos eletroanalíticos para a determinação do CPA e o método proposto

O método proposto por El-Enany e colaboradores (2010) apresentou faixa linear de concentração e limite de detecção (LD) maiores do que os valores obtidos neste trabalho. E, além disso, os autores utilizam a técnica polarográfica e o eletrodo gotejante de mercúrio que apresenta alta toxicidade, o que dificulta o seu manuseio.

O trabalho desenvolvido por Ibrahim e colaboradores (2018) obtiveram uma faixa linear de concentração e LD menores do que os obtidos neste trabalho. Contudo, foi utilizado um eletrodo modificado que necessita de um longo tempo de preparo e materiais que possuem um custo relativamente maior para a modificação dos eletrodos. Entretanto, ao se utilizar o EDDB, não é necessário realizar modificações, apenas uma

polarização catódica já é suficiente para obter excelentes respostas na determinação do CPA.

Desta maneira, o método proposto, frente aos outros trabalhos eletroanalíticos, visa à simplicidade de manuseio, rapidez e alta sensibilidade. Não houve a necessidade de modificação de eletrodo (apenas polarização catódica), apresenta alta frequência analítica, menor gasto de reagentes e há a possibilidade de automatização do sistema. Também não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizem a cronoamperometria e o sistema FIA para a determinação de CPA empregando-se o EDDB.

Tabela 10 – Condições analíticas de métodos eletroanalíticos para a determinação do CPA previamente reportado na literatura comparado ao método proposto

Técnica	Eletrodo	Intervalo linear de concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Características Analíticas	Referência
^a PPD	Eletrodo de mercúrio	1,20 – 33,6	0,31	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de acumulação • Desoxigenação com nitrogênio 	(El-Enany et al., 2010)
^b VOQ	AuNPs/f-MWNCT-GCPE	0,099 – 11,5	0,016	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo para modificação de eletrodo • Uso de materiais com custo relativamente alto 	(Ibrahin et al., 2018)
^c CA-FIA	EDDB	1,0 – 80,0	0,23	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrodo sem modificação • Alta frequência analítica • Simplicidade 	Este trabalho

^aPPD = polarografia de pulso diferencial

^bVOQ = voltametria de onda quadrada

^cCA-FIA = cronoamperometria acoplado ao sistema FIA

Diante disso, os estudos de repetibilidade intra e entre-dias foram realizados para avaliar a precisão do método desenvolvido. A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas realizadas no mesmo dia (N = 10) e a repetibilidade entre-dias foi determinada por medidas realizadas em 5 dias diferentes (N = 5) com soluções de CPA em duas concentrações: 8,0 e 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os valores de DPR obtidos, apresentados na Tabela 11, foram menores 4,1% e demonstram que o método proposto apresenta boa precisão.

Tabela 11 – Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intra e entre-dias para o CPA

CPA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Intra-dias DPR ^a (%)	Entre-dias DPR ^b (%)
8,0	4,1	3,3
30,0	2,2	1,4

^a(n=10); ^b(n=3)

4.3.3.2 DETERMINAÇÃO DO CPA EM AMOSTRA DE MEDICAMENTO E URINA SINTÉTICA UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Inicialmente foi avaliado o efeito de possíveis interferentes que geralmente são encontrados na matriz das amostras analisadas. As substâncias investigadas como possíveis interferentes foram: ácido úrico (AU), lactose (LAC) e ureia (U), na proporção de 1:1 (CPA:interferente). Além disso, também foi realizado um teste na presença de ácido úrico e ureia juntos, pois ambos estão presentes na urina. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

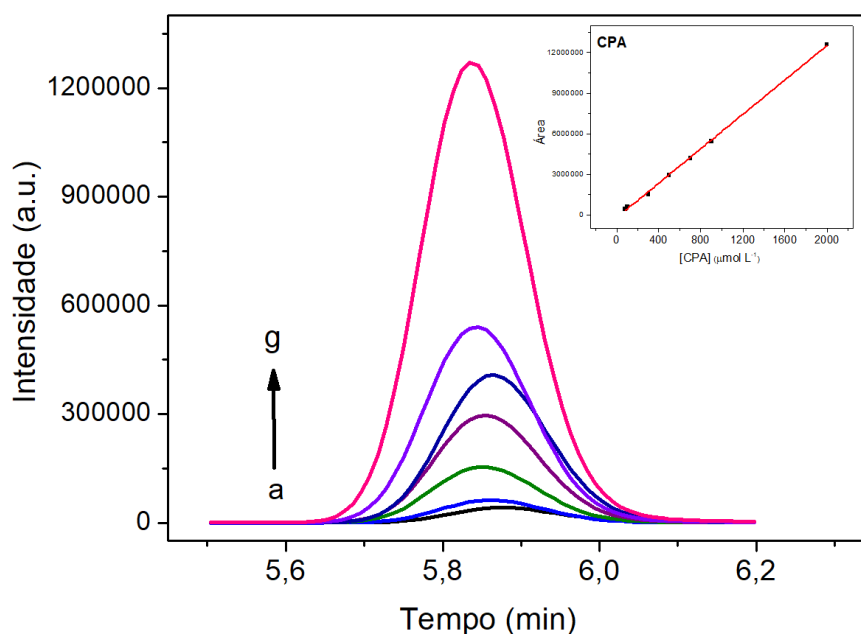
Tabela 12 – Erro relativo obtido no estudo de interferentes para o CPA

Interferente	Erro relativo (%)
Ácido úrico	3,54
Lactose	1,87
Ureia	1,08
Ácido úrico: Ureia	4,83

Os resultados obtidos para o estudo de interferentes apresentaram erros relativos menores do que 5,0%, indicando que não há interferência significativa destas substâncias na determinação do CPA.

A CLAE foi utilizada como método comparativo ao método proposto para a determinação do CPA em uma amostra de medicamento. Nas condições experimentais já descritas (seção 3.5), o CPA apresentou tempo de retenção de 5,80 min. O cromatograma e a curva analítica estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 – Cromatogramas obtidos para o CPA (a – g): 80, 100, 300, 500, 700, 900 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($t = 5,80$ min; $\lambda = 220$ nm), fase móvel metanol/água (80:20 v/v) e vazão de 1,0 mL min^{-1} . **Gráfico inserido:** Curva analítica obtida para o CPA na faixa de concentração de 80 a 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



A equação da curva analítica obtida para o CPA por CLAE foi:

$$A \text{ (a.u.)} = -199302,66 + 6357,50 [\text{CPA } (\mu\text{mol L}^{-1})] \quad (R^2 = 0,998) \quad (\text{Eq. 10})$$

O método proposto foi utilizado em amostra farmacêutica (marca A) com dosagem de 50,0 mg de CPA. Ressalta-se que para o método proposto, o preparo de amostra foi apenas a dissolução em acetona e, posterior diluição no eletrólito suporte, evidenciando a rapidez e viabilidade do método.

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados obtidos pelo método proposto (CA-FIA) e o método comparativo (CLAE).

Tabela 13 – Resultados obtidos na determinação de CPA em amostra de medicamento usando o método proposto e o método cromatográfico

Amostra	Quantidade (mg comprimido ⁻¹) ^a			
	Rotulado	CLAE	CA-FIA	Erro (%)
A	50,0	59 ± 3	54 ± 2	-8,5

^aMédia de 3 injeções.

^bErro (%) = 100 × (método CA – método CLAE) / método CLAE

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois procedimentos, CA e CLAE, aplicou-se o teste *t* de *student*. O valor de *t* calculado para a amostra foi de 2,73 e, o valor de *t* crítico igual a 2,78. Desta maneira, o método proposto empregando CA-FIA e o procedimento de referência (CLAE) não apresentou diferença significativa a um nível de confiança de 95%.

Estudos de adição e recuperação foram realizados em amostra de urina sintética em duas concentrações, a fim de avaliar a interferência da matriz na determinação do CPA, como mostra a Tabela 14.

Tabela 14 – Estudo de adição e recuperação de CPA em amostra de urina

Urina		
Adc. ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec. ^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
10,0	9,8 \pm 0,3	98
40,0	39,2 \pm 0,2	99

^aAdc.: Valor Adicionado

^bRec.: Valor Recuperado

As recuperações de CPA nas amostras de urina para as duas concentrações estudadas foram de 98 e 99%. Esses valores indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na quantificação do CPA e que o método proposto pode ser utilizado para na análise de amostras de urina reais que contenham o CPA.

O procedimento eletroanalítico desenvolvido para a quantificação de CPA se mostrou simples, rápido e eficiente, com a possibilidade de realizar-se a quantificação deste em amostra farmacêutica e biológica, considerando seu baixo LD e LQ. Ademais, apresentou vantagens como um menor consumo de reagentes, baixo tempo de análise e alta frequência analítica.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos eletroanalíticos baseados na detecção CA acoplada a um sistema FIA com o EDDB-PTC para determinação de EE2 e CPA em amostras de medicamentos, e também estudos de adição e recuperação em amostras de água do lago Igapó e urina sintética. Dentre as vantagens apresentadas pelo método proposto comparado aos demais métodos encontrados na literatura e o método comparativo (CLAE), destacam-se a alta frequência de análise, aproximadamente 83 injeções por hora, baixo custo relativo, simplicidade na realização das análises, dispensa etapas laboriosas de preparo das amostras e utiliza um eletrodo sem modificação da sua superfície, alta precisão dos resultados e baixa geração de resíduos provenientes das análises.

Os LDs e LQs obtidos, 0,023 e 0,077 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para EE2 e 0,23 e 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o CPA, respectivamente, foram satisfatórios. O método também apresentou boa precisão nos estudos realizados em diferentes concentrações.

A exatidão da metodologia foi realizada por meio da quantificação do EE2 e CPA em amostras de medicamentos e os resultados foram concordantes com os obtidos pelo método comparativo. Estudos de adição e recuperação foram realizados em amostras de água do lago Igapó e urina sintética, as recuperações foram satisfatórias, indicando a baixa interferência da matriz das amostras na determinação desses hormônios e a viabilidade da análise de amostras reais que os contenham.

Portanto, diante desses resultados conclui-se que os métodos eletroanalíticos desenvolvidos podem ser bastante viáveis para a utilização no controle de qualidade do EE2 e CPA em medicamentos, e há também a possibilidade de serem utilizados no monitoramento de amostras ambientais, como amostras de água e biológicas, como a urina. Além disso, o método proposto pode ser atrativo para análises de rotina em indústrias farmacêuticas, proporcionando uma análise mais econômica e ambientalmente mais sustentável.

6. REFERÊNCIAS

ALFARO, M.A.Q.; FERRO, S.; MARTINEZ-HUITLE, C.A.; VONG, Y.M. Boron doped Diamond electrode for the wastewater treatment. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 227, 2006.

ANDRIEUX, C.P.; SAVEANT, J.M. Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs. homogeneous catalysis of electrochemical reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 93, n. 3, p. 163-168, 1978.

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

ATKINSON, S.K.; MARLATT, V.L.; KIMPE, L.E. et al. The occurrence of steroidal estrogens in South-eastern Ontario wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 430, p. 119-125, 2012.

AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; TYAGI, R.D.; ADAMS, C.D.; SURAMPALLI, R.Y. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 525-539, 2006.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

BARREIROS, L.; QUEIROZ, J.F.; MAGALHÃES, L.M. et al. Analysis of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in biological and environmental matrices – A review. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 243-262, 2016.

BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10-11, p. 753-761, 2004.

BILA, D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e Consequências. **Química Nova**, v. 30 n.3 p. 651-666, 2007.

BOND, A.M.; HERITAGE, I.D. Normal pulse cathodic stripping voltammetry of ethynylestradiol. **Analytical Chemistry**, v. 56 p. 1222-1226, 1984.

BORGES, N.C.; MAZUQUELI, A.; MORENO, R.A.; ASTIGARRAGA, R.B. et al. Cyproterone acetate quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. **Arzneimittelforschung**, v. 59, n. 7, p. 335-344, 2009.

BOVIER, T.F.; ROSSI, S.; MITA, D.G.; DIGILIO, F.A. Effects of the synthetic estrogen 17- α -ethinylestradiol on *Drosophila melanogaster*: Dose and gender dependence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162 p. 625-632, 2018.

BROCENSCHI, R. F.; ROCHA-FILHO, R. C.; DURAN, B. & SWAIN, G. M. The analysis of estrogenic compounds by flow injection analysis with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 126, p. 12-19, 2014a.

BROCENSCHI, R.F.; ROCHA-FILHO, R.; BIAGGIO, S.R.; BOCCHI, N. DPV and SWV determination of estrone using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 26, p. 1588-1597, 2014b.

BROCENSCHI, R. F.; ROCHA-FILHO, R.C.; LI, L.; SWAIN, G.M. Comparative electrochemical response of estrone at glassy-carbon, nitrogen-containing tetrahedral amorphous carbon and boron-doped diamond thin-film electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 712, p. 207-214, 2014c.

CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S.E.; GREEN, F.B; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W.T.. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1265-1280, 2006.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M.; LLOMPART, M.; GARCIA-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GOMEZ, M.; TERNES, T. Behavior of Pharmaceuticals, Cosmetics and Hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, p. 2918, 2004.

CARGOUET, M.; PERDIZ, D.; MOUATASSIM-SOUALI, A.; TAMISIER-KAROLAK, S.; LEVI, Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). **Science of the Total Environment**, v. 324, p. 55-66, 2004.

CARVALHO, A.E. **Caracterização eletroquímica de eletrodos de diamante dopado com boro em função de seu pré-tratamento**. São Carlos, Departamento de Química – UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 149 p.

CHRISTIAENS, B.; FILLET, M.; CHIAP, P.; RBEIDA, O.; CECCATO, A.; STREEL, B.; DE GREEVE, J.; CROMMEN, J.; HUBERT, Ph. Fully automated method for the liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of cyproterone acetate in human plasma using restricted access material for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1056, p. 105-110, 2004.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, Fate and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.

CORRÊA, D.A.S.; FELISBINO-MENDES, M.; MENDES, M.S.; MALTA, D.C.; VELASQUEZ-MELENDZ, G. Fatores associados ao uso contraindicado de contraceptivos orais no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 1, p.1-10, 2017.

DE BARROS, R. D. M.; RIBEIRO, M. C.; NA-SUMODJO, P.T.; JULIAO, M.S.D.; SERRANO, S.H.P.; FERRAIRA, N.G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I.: Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317, 2005.

DEROCO, P.B.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.; FATIBELLO-FILHO, O. Selective and simultaneous determination of indigo carmine and allura red in candy samples at the nano-concentration range by flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Food Chemistry**, v. 247, p. 66-72, 2018.

DOS SANTOS, W.T.P.; GIMENES, D.T.; RICHTER, E.M.; ANGNES, L. análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.

EISELE, A.P.P.; CLAUSEN, D.N.; TARLEY, C.R.T.; DALL'ANTONIA, L.H.; SARTORI, E.R. Simultaneous square-wave voltammetric determination of paracetamol, caffeine and orphenadrine in pharmaceutical formulations using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 7, p. 1734-1741, 2013.

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

ELKS, J. **The Dictionary of Drugs: Chemical Data: Structures and Bibliographies**. Springer, 2014, p. 339 ISBN 978-1-4757-2085-3.

FALONE, M.F.; SALAMANCA-NETO, C.A.R.; MORAES, J.T.; SARTORI, E.R. Electrochemical evaluation and voltammetric determination of laxative drug bisacodyl on boron-doped diamond electrode. **Measurement**, v. 137, p. 464-469, 2019.

FELIX, F.S.; BRETT, C.M.A.; ANGNES, L. Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1622-1627, 2007.

FILHO, R. W.; ARAUJO, J. C.; VIEIRA, E. M., Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

GAN, P.; COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. The voltammetry and electroanalysis of some estrogenic compounds at modified Diamond electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2423-2434, 2013.

GARCIA, A.F.; ROLLEMBER, M. C. Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1592-1596, 2007.

GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993

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

GRANGER, M.C.; SWAIN, G.M. The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes. **Journal of Electrochemical Society**, v.146, n.12, p. 4551, 1999.

GRUBER, D.M.; SATOR, M.O.; JOURA, E.A.; KOKOSCHKA, E.M.; HEINZE, G.; HUBBER, J.C. Topical cyproterone acetate treatment in women with acne. **Archives of Dermatology**, v. 134, p. 459-463, 1998.

HASSONVILLE, S.H. de; CHIAP, P.; LIÉGEOIS, J-F.; EVRARD, B.; DELATTRE, L. CROMMEN, J.; PIEL, G.; HUBERT, P. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyproterone acetate in human skin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 133-143, 2004.

HOLT, K.B.; BARD, A.J.; SHOW, Y.; SWAIN, G.M. Scanning electrochemical microscopy and conductive probe atomic force microscopy studies of hydrogen-terminated boron-doped diamond electrodes with different doping levels. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, p. 15117-15127, 2004.

IBRAIN, M.; IBRAHIN, H.; ALMANDIL, N.; KAWDE, A-N. Gold nanoparticles/f-MWCNT nanocomposites modified glassy carbon paste —electrode as a novel voltammetric sensor for the determination of cyproterone acetate in pharmaceutical and human body fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 274, p. 123-132, 2018.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOPPER, J.; CVAKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. **Diamond Related. Materials**, v. 12, p. 1940-1949, 2003

JOHNSON, A.C.; WILLIAMS, R.J. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone and ethinylestradiol at sewage treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 3649-3658, 2004.

JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T. et al., Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 3047-3055, 2004.

JOTHI, L.; NEOGI, S.; JAGANATHAN, S.K.; NAGESWARAN, G. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by a novel electrochemical

sensor based on N₂/Ar RF plasma assisted grapheme nanosheets/graphene nanoribbons. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p. 236-242, 2018.

KIDD, K.A.; BLANCHFIELD, P.J.; MILLS, K.H.; PALACE, V.P.; EVANS, R.E.; LAZORCHAK, J.M.; FLICK, R.W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 204, n. 21, p. 8897-8901, 2007.

KRAFT, A. Doped Diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, n.5, p. 355-385, 2007.

KRISHNAMOORTHY, K.; SUDHA, V.; MURUGESAN, S.; THANGAMUTHU, R. Simultaneous determination of dopamine and uric acid using copper oxide nano-rce modified electrode. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 748, p. 338-347, 2018.

LARCHER, S.; YARGEAU, V. Biodegradation of 17 α -ethinylestradiol by heterotrophic bacteria. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 17-22, 2013.

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. 223, p. 367-374, 2001.

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

LI, J.; JIANG, L.; LIU, X.; LV, J. Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soil – water system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 76, p. 3-7, 2013.

LIMA, A.B. **Determinação de verapamil e oxcarbazepina em amostras de urina e formulações farmacêuticas por amperometria pulsada em FIA**. Diamantina, UFVJM – MG, 2016. Dissertação, 88p.

LIMA, A.B.; FERREIRA, L.F.; BARBOSA, S.L. et al. Selective determination of verapamil in pharmaceuticals and urine using a boron-doped diamond electrode coupled to flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 30, p. 1880-1885, 2018.

LIMA, D.L.D.; SCHNEIDER, R.J.; ESTEVES, V.I. Sorption behavior of EE2 on soils subjected to different long-term organic amendments. **Science of the total environment**, v. 423, p. 120-124, 2012.

LIU, X.; FENG, H.; LIU, X.; WONG, D.K.Y. Electrocatalytic detection of phenolic estrogenic compounds at NiTPPS|carbon nanotube composite electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 689, p. 212-218, 2011.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p.712A – 724A, Jun. 1983

LORIMER, J.P.; MASON, T.J.; PLATTES, M.; WALTON, D.J. Passivation phenomena during sonovoltammetric studies on copper in strongly alkaline solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 568, p. 379-390, 2004.

LOURENCAO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of antihypertensive drugs by flow injection analysis using multiple pulse amperometric detection with a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 754, p. 154-159, 2015.

LOURENCAO, B.C.; PINHEIRO, R.A.; SILVA, T.A.; CORAT, E.J.; FATIBELLO-FILHO, O. Porous boron-doped diamond/CNT electrode as electrochemical sensor for flow-injection analysis applications. **Diamond & Related Materials**, v. 74, p. 182-190, 2017.

MA, L.; YATES, S.R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 640-641, p. 529-542, 2018.

MARKOPOULOU, C.; KOUNDOURELLIS, J.E. development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of ethinyl estradiol, cyproterone acetate, and norgestrel in breast milk following solid-phase extraction. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 685-700, 2006.

MARTÍNEZ, N.A.; PEREIRA, S.V.; BERTOLINO, F.A. et al. Electrochemical detection of powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 723, p. 27-32, 2012.

MES, T.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in STPs for domestic wastewater. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 4, p. 275-311, 2005.

MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped Diamond electrode. **Talanta**, v. 99, p. 883-889, 2012a.

MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped Diamond electrode. **Talanta**, v. 97, p. 291-297, 2012b.

MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.; FATIBELLO-FILHO, O. Simple flow injection analysis system for simultaneous determination of phenolic

antioxidants with multiple pulse amperometric detection at a boron-doped Diamond electrode. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 8658-8663, 2010.

MEDEIROS, R.A. **Desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de antioxidantes e corantes em produtos alimentícios empregando um eletrodo de diamante dopado com boro**. São Carlos, Departamento de Química – UFSCar, 2011. Tese, 155 p.

MONTAGNER, C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R.D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

MOREIRA, D.A.R.; DE OLIVEIRA, F.M.; PIMENTEL, D.M. et al. Determination of Colchicine in Pharmaceutical Formulations and Urine by Multiple-Pulse Amperometric Detection in an FIA System Using Boron-Doped Diamond Electrode. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1796-1802, 2018

NAIR, S.G.; PATEL, D.P.; GONZALEZ, F.J.; PATEL, B.M.; SINGHAL, P.; CHAUDHARY, D.V. Simultaneous determination of etonogestrel and ethinylestradiol in human plasma by UPLC/MS-MS and its pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 5, p. 4165, 2018.

NGUNDI, M.M.; SADIK, O.A.; YAMAGUCHI, T.; SUYE, S-I. First comparative reaction mechanisms of β -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 61-67, 2003.

NUNES, C.N.; PAULUK, L.E.; FELSNER, M.L.; ANJOS, V.E.; QUINÁIA, S.P. Rapid screening method for detecting ethinyl estradiol in natural water employing voltammetry. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, article ID 3217080, p. 1-7, 2016.

OLIVEIRA, T.C.; FREITAS, J.M.; MUÑOZ, R.A.A.; RICHTER, E.M. Development of a novel versatile method for determination of two antihistamines in association with naphazoline using cathodically pretreated boron-doped Diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 30, p. 868-876, 2018.

PACHECO, W.F.; SEMAAN, F.S.; ALMEIDA, V.G.K.; RITTA, A.G.S.L.; AUCÉLIO, R.Q. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PANTER, G.H.; THOMPSON, R.S.; BERESFORD, N. et al. Transformation of non-estrogenic steroidal metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. **Chemosphere**, v. 38, p. 3579-3596, 1999.

PAUWELS, B.; WILLE, K.; NOPPE, H. et al. 17α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17β -estradiol and estriol. **Biodegradation**, v. 19, p. 683-693, 2008.

PAVINATTO, A.; MERCANTE, L.A.; LEANDRO, C.S. et al. Layer-by-layer assembled films of chitosan and multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical detection of 17 α -ethinylestradiol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 755, p. 215-220, 2015.

PEREIRA, G. F.; ROCHA-FILHO, R. C.; BOCCHI, N.; BIAGGIO, S. R. Electrochemical degradation of bisphenol A using a flow reactor with a boron-doped diamond anode. **Chemical Engineering Journal**, v. 198, p. 282-288, 2012.

PEREZ, C.; SIMÕES, F.R.; CODOGNOTO, L. Voltammetric determination of 17 α -ethinylestradiol hormone in supply dam using BDD electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, p. 2471-2478, 2016.

PLESKOV, Y.V. Synthetic Diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n.11, p. 1045-1050, 2000.

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of diamond: A review. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275, 2002.

PLETCHER, D.; GREFF, R.; PEAT, R.; PETER, L.M.; ROBINSON, J. **Instrumental Methods in Electrochemistry**, 3^o edição, John Wiley & Sons, Inc., Nova Jersey, 2006.

RA, J.S.; LEE, S.H.; LEE, J. et al. Occurrence of estrogenic chemicals in South Korean surface waters and municipal wastewaters. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 101, 2011.

RIPOLLÉS, C.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J.V.; LÓPEZ, F.J.; HERNÁNDEZ, F. Determination of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in water at sub-ppt levels by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5028-5037, 2014.

SALAMANCA-NETO, C.A.R.; FELSNER, M.L.; GALLI, A.; SARTORI, E.R. In-house validation of a totally aqueous voltammetric method for determination of diltiazem hydrochloride. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 837, p. 159-166, 2019.

SALAZAR-BANDA, G.R.; ANDRADE, L.S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P.S.; ROCHA-FILHO, R.C.; AVACA, L.A. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped Diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 4612–4619, 2006.

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.

SARTORI, E.R.; CLAUSEN, D.N.; PIRES, I.M.R.; SALAMANCA-NETO, C.A.R. Sensitive square-wave voltammetric determination of tadalafil (Cialis®) in

pharmaceutical samples using a cathodically pretreated boron-doped Diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 77, p. 153-158, 2017.

SCALA-BENUZZI, M.L.; TAKARA, E.A.; ALDERETE, M. et al. Ethinylestradiol quantification in drinking water sources using a fluorescent paper based immunosensor. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 287-293, 2018.

SIEGENTHALER, P.F.; BAIN, P.; RIVA, F.; FENT, K. Effects of antiandrogenic progestins, chlormadinone and cyproteroneacetate, and the estrogen 17 β -ethinylestradiol (EE2), and their mixtures: Transactivation with human and rainbowfish hormonereceptors and transcriptional effects in zebrafish (*Danio rerio*)eleuthero-embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 142–162, 2017.

SHAMSA, M.; GHOSH, S.; CALIZO, I.; RALCHENKO, V.; POPOVICH, A.; BALANDIN, A. A Thermal conductivity of nitrogenated ultrananocrystalline diamond films on silicon. **Journal of Applied Physics**, v. 103, 2008.

SILVA, C.P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Process for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 38-58, 2012.

SMAJADOR, J.; PIECH, R.; PIEK, M.; PACZOSA-BATOR, B. Sensitive voltammetric determination of ethinyl estradiol on carbon black modified electrode. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 164, n. 13, p. H885-H889, 2017.

SOHRABI, M.R.; ABDOLMALEKI, P.; ESMAEILI, E. A. Simultaneous spectrophotometric determination of cyproterone acetate and ethinyl estradiol in tablets using continuous wavelet and derivative transform. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 77, p. 107-111, 2010.

SOLOMON, G.M.; SCHETTLER, T. Environmental and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications. **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, n. 11, p. 1471-1473, 2000.

SOURI, E.; JALALIZADEH, H.; FARSAM, H.; GHADIRI, R.; AMANLOU, M. simultaneous determination of cyproterone acetate and ethinylestradiol in tablets by derivative spectrophotometry. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 949-951, 2005.

SPECK, U.; WENDT, H.; SCHULZE, P.E.; JENTSCH, D. Bio-availability and pharmacokinetics of cyproterone acetate-14C and ethinyloestradiol-3H after oral administration as a coated tablet (SH B 209 AB). **Contraception**, v.14, n.2, 1976.

STANKOVIC, D.M.; KALCHER, K. Amperometric quantification of the pesticide ziram at boron doped diamond electrodes using flow injection analysis. **Sensors and Actuators B**, v. 233, p. 144-147, 2016.

SUFFREDINI, H.B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L. et al. Enhanced Electrochemical Response of Boron-Doped Diamond Electrodes Brought on by a Cathodic Surface Pre-Treatment. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 22-23, 2004.

SUSSMANN, R.S. **CVD Diamond for electronic devices and sensors**. New York: John Wiley, 2009. 571 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

SVORC, L.; KALCHER, K. Flow-injection amperometric determination of yohimbine alkaloid in dietary supplements using a boron-doped Diamond electrode. **Sensor and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 215-218, 2014.

TROUILLON, R.; EINAGA, Y.; GIJS, M.A.M. Cathodic pretreatment improves the resistance of boron-doped diamond electrodes to dopamine fouling. **Electrochemistry Communications**, v. 24, p. 92-95, 2014.

VALLEJO, A.; USOBIAGA, A.; MARTINEZ-ARKARAZO, I. et al. Ultrasonic-assisted derivatization of estrogenic compounds in a cup horn booster and determination by GC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 104-111, 2010.

VEGA, D.; AGUÍ, K., GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M. Electrochemical detection of phenolic estrogenic compounds at carbon nanotube-modified electrodes. **Talanta**, v. 71, p. 1031-1038, 2007.

VERBINNEN, R.T.; NUNES, G.S. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837-1842, 2010.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. Hoboken, New York: John Wiley, 2006. 250 p.

WONG, A.; SANTOS, A.M.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 85, p. 68-73, 2018.

YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D.A.; FUJISHIMA, A. Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated Diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Acta** v. 473, n. 1-2, p. 173-178, 1999.

YANG, N.; YU, S.; MACPHERSON, J.V.; EINAGA, Y.; ZHAO, H.; ZHAO, G.; SWAIN, G.M.; JIANG, X. Conductive diamond: synthesis, properties, and electrochemical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 48, p. 157-204, 2019.

YU, Z.; XIAO, B.; HUANG, W.; PENG, P. Sorption of steroid estrogens to soils and sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 531-539, 2004.