

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas

Eliziana Santana Gomes

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ESTRIOL EM FORMULAÇÃO
FARMACÊUTICA E URINA UTILIZANDO UM ELETRODO DE CARBONO
VÍTREO MODIFICADO COM UM FILME DE POLI(METIONINA) E COBALTO**

Diamantina

2017

Eliziana Santana Gomes

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ESTRIOL EM FORMULAÇÃO
FARMACÊUTICA E URINA UTILIZANDO UM ELETRODO DE CARBONO
VÍTREO MODIFICADO COM UM FILME DE POLI(METIONINA) E COBALTO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr.^a Andréa Renata Malagutti
Coorientador: Prof. Dr. Henrique A. J. L. Mourão.

Diamantina

2017

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

G633d Gomes, Eliziana Santana.
Determinação voltamétrica de estriol em formulação farmacêutica e urina utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de poli(metionina) e cobalto / Eliziana Santana Gomes – Diamantina, 2017.
101 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Renata Malagutti
Coorientador: Prof. Dr. Henrique Aparecido de Jesus Loures Mourão

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Estriol. 2. Eletroanálise. 3. Voltametria de pulso diferencial. 4. Eletrodo de carbono vítreo modificado com polimetionina e cobalto. I. Malagutti, Andréa Renata. II. Mourão, Henrique Aparecido de Jesus Loures. III. Título.

CDD 615

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

ELIZIANA SANTANA GOMES

Determinação voltamétrica de estriol em formulação farmacêutica e urina utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de poli(metionina) e cobalto.

Dissertação apresentada ao
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -
STRICTO SENSU, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MAGISTER
SCIENTIAE EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Orientador : Prof.^a Dr.^a Andrea Renata
Malagutti

Data da aprovação : 28/07/2017


Prof. Dr. LUCAS FRANCO FERREIRA - UFVJM


Prof. Dr. LEANDRO RODRIGUES DE LEMOS - UFVJM


Prof.^a Dr.^a ANDREA RENATA MALAGUTTI - UFVJM

Dedico esta dissertação aos meus pais,
que tanto me apoiaram e incentivaram
o meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

A cada vitória, o reconhecimento devido ao nosso Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor. Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa.

À orientadora, a Prof^a. Dr.^a Andréa Renata Malagutti e ao coorientador o Prof. Dr. Henrique A. J. L. Mourão, que me cederam um pouco do seu tempo, me capacitando e tratando com igualdade e respeito.

Aos técnicos do laboratório, em especial ao Fernando, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

À minha família, pelo amor e apoio de sempre.

Aos amigos queridos, de perto e de longe, a minha eterna gratidão.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/UFVJM e a todos os professores do Departamento de Farmácia pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos e compartilhados durante a minha caminhada até aqui.

À CAPES pela bolsa de estudos oferecida.

Às pessoas que foram solidárias ao meu estudo e contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas de curso, com os quais muito aprendi.

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos,
e não tivesse caridade,
seria como o metal que soa ou como o sino que tine.
(BÍBLIA, I Coríntios, 13, 1).

RESUMO

O estriol ($C_{18}H_{24}O_3$, denominado E3) é o principal esteroide estrogênico produzido na gravidez. O uso do estriol é comum para o tratamento da menopausa como alternativa ao 17β -estradiol, estrona ou a uma combinação destes dois fármacos. O principal objetivo deste trabalho foi estudar o perfil voltamétrico do estriol utilizando a voltametria cíclica e desenvolver uma metodologia para a sua determinação em comprimidos e urina utilizando a voltametria de pulso diferencial (DPV) e o eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de polimetionina e cobalto. Os resultados mostraram que em solução de tampão fosfato a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) o E3 oxidou irreversivelmente no potencial de +0,58V, apresentando uma boa definição do pico. A curva analítica para o E3 foi linear no intervalo de concentração de $0,60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} - 4,76 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,996$) e $5,66 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} - 9,90 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,994$), com limites de detecção e de quantificação iguais a $3,40 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,13 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A precisão foi avaliada através de análises voltamétricas do estriol realizadas em um mesmo dia e em dias diferentes e apresentaram desvios padrões relativos (RSD) inferiores a 5,0%, mostrando que o método desenvolvido é preciso. Os estudos sobre interferentes mostraram que as substâncias presentes nas amostras de comprimido (lactose, estearato de magnésio e amido) ou urina (ácido úrico, ácido ascórbico e ácido cítrico) não interferiram de maneira significativa na determinação do E3. Além disso, o método desenvolvido foi comparado estatisticamente com um método citado na farmacopéia através do teste-t e do teste-F. Os resultados mostraram que os valores de t e F calculados foram menores do que os valores de t e F críticos, indicando que não houve diferença estatística significativa entre os métodos. A exatidão do método foi avaliada também por estudos de adição e recuperação. As recuperações do E3 variaram de 97,7 – 100,9% para a formulação farmacêutica e 99,0 – 100,9% para a urina, indicando que não houve efeitos de interferência de matriz significativos e que o método apresenta boa exatidão. Desta forma, a validação da metodologia desenvolvida demonstrou que o método proposto pode ser aplicado com sucesso na determinação do E3 em medicamentos e urina humana.

Palavras chave: Estriol, Eletroanálise, Voltametria de pulso diferencial, Eletrodo de carbono vítreo modificado com polimetionina e cobalto.

ABSTRACT

The estriol ($C_{18}H_{24}O_3$, named as E3) is the main estrogenic steroid produced during pregnancy. The E3 is used to treatment of menopause as an alternative for 17β -estradiol, estrone or a combination of both. The main goal of this work was to study the voltammetric profile of E3 using cyclic voltammetry in order to develop a methodology for its determination in tablets and urine using differential pulse voltammetry (DPV) and the glass carbon electrode modified with a film of polymethionine and cobalt. The results showed that the E3 was oxidized at + 0.58V in a 0.1 molL^{-1} phosphate buffer solution (pH 7.0), giving a good peak definition. The analytical curve for E3 was linear in the concentration range of $0.60 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ – $4.76 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ ($R^2 = 0.996$) and $5.66 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ – $9.90 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ ($R^2 = 0.994$ with limits of detection and quantification of $3.40 \times 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$ and $1.13 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$, respectively. The precision was evaluated by recording voltammograms of E3 on the same or different day. The relative standard deviations were lower than 5.0% for each test, indicating that the developed method has good precision. The interfering study showed that the tested substances do not interfered significantly in the determination of E3, as for both tablets (lactose, magnesium stearate and starch) or urine test (uric acid, ascorbic acid and citric acid). Furthermore, the developed method was compared to the suggested method from American Pharmacopoeia using the t-test and the F-test. The results showed that the calculated values of t and F were lower than their critical values, indicating no significant statistical difference between the methods. The accuracy of the method was also evaluated by studies of addition and recovery. The recovery of E3 ranged from 97.7 – 100.9% for the pharmaceutical formulation and 99.0 – 100.9% for the urine, indicating no significant effects of matrix interference and that the developed method presented accuracy. Thus, the validation of the developed methodology demonstrated that the proposed method can be applied successfully to the determination of E3 in drugs and human urine.

Keywords: Estriol, Electroanalysis, Differential pulse voltammetry, Polymethionine and cobalt modified glassy carbon electrode.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O sistema endócrino humano	33
Figura 2 - Estrutura química da estrona, 17 β -estradiol e do estriol	35
Figura 3 - Concentração plasmática dos hormônios durante a gestação.....	38
Figura 4 - Sinais de excitação de tensão <i>versus</i> tempos empregados na voltametria	48
Figura 5 - Gráfico típico de Nyquist (Z_{im} vs Z_{re}). (a) Espectro de impedância faradaica e (b) Circuito equivalente de medida de impedância eletroquímica faradaica.....	51
Figura 6 - Célula eletroquímica utilizada nas medidas eletroquímicas contendo: eletrodo de trabalho (GC), eletrodo de referência (Ag/AgCl) e eletrodo auxiliar (placa de Pt).....	55
Figura 7 - Potenciostato/galvanostato PGSTAT 128 N acoplado a um microcomputador utilizado para as medidas eletroquímicas.....	55
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos registrados usando o GCE na ausência (a) e na presença (b) de estriol; com o uso de poly(Met)/GCE na ausência (c) e na presença (d) de estriol e voltamogramas cíclicos obtidos usando o poly(Met)Co/GCE na ausência (e) e na presença (f) de Estriol. [Estriol] = 0,14 mmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 7,0, ν = 100 mVs ⁻¹	61
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos da eletropolimerização (10 ciclos) do eletrodo de carbono vítreo em solução contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de metionina e 5,0 mmolL ⁻¹ de CoCl ₂ .6H ₂ O em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 4,0, ν = 100 mVs ⁻¹	63
Figura 10 - Esquema de reação entre a L-metionina e a superfície do GCE proposto por Ma e Sun (2007).	64
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos registrados para uma solução de estriol 0,14 mmol L ⁻¹ em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7, ν = 100 mVs ⁻¹ , usando o poly(Met)Co/GCE preparado com diferentes números de ciclos de polimerização. Inserido: Gráfico I_p <i>versus</i> número de ciclos de polimerização	65

Figura 12 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (2,5 – 500 mV s ⁻¹) para o poly(Met)/Co/GCE em solução de K ₃ Fe(CN) ₆ 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 1,0 mol L ⁻¹ . (b) Gráfico com o registro de I _p vs. v ^{1/2} para correntes de pico anódica (I _{pa}) e catódica (I _{pc}).....	66
Figura 13 - Gráficos de espectroscopia de impedância eletroquímica do CGE sem modificação (curva a), do poly(Met)/GCE (curva b) e do poly(Met)Co/GCE (curva c), obtidos em solução 0,1 mol L ⁻¹ de KCl como eletrólito de suporte contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ . Inserido: Circuito equivalente do tipo Randles. R _s , C _{dl} , R _{ct} e W representam a resistência da solução eletrolítica, capacitância de dupla camada, a resistência de transferência de carga e a impedância de Warburg, respectivamente. Escala de frequência de 0,1 -10 ⁵ hertz.....	68
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando o poly(Met)Co/GCE na ausência (a) e na presença (b) de estriol. [estriol] = 0,14 mmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 7,0, v = 100 mV s ⁻¹	69
Figura 15 - Voltamogramas cíclicos de uma solução de estriol 0,14 mmol L ⁻¹ em tampão Britton-Robinson 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH, obtidos com o poly(met)Co/GCE em v = 50 mV s ⁻¹	70
Figura 16 - Influência do pH sobre a corrente de pico anódica (I _{pa}) e sobre o potencial de pico anódico (E _{pa}) do estriol utilizando tampão Britton–Robinson 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito de suporte.	70
Figura 17 - Esquema da reação de oxidação eletroquímica do estriol proposto por Santos <i>et al.</i> (2010).	71
Figura 18 - Voltamogramas cíclicos do estriol 0,14 mmol L ⁻¹ em diferentes soluções de eletrólito suporte utilizando o poly(Met)Co/GCE, (v = 100 mVs ⁻¹). Linha preta: tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7. Linha vermelha: tampão fosfato (PBS) 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7.	72
Figura 19 - (a) Voltamogramas cíclicos para o estriol 0,14 mmol L ⁻¹ em tampão PBS 0,1mol L ⁻¹ , pH = 7, obtidos empregando o poly(Met)Co/GCE em diferentes velocidades de varredura. (b) Dependência da corrente de pico de oxidação com a velocidade de varredura. (c)	

Dependência da corrente de pico de oxidação com a raiz quadrada da velocidade de varredura.	
(d) Logaritmo da corrente de pico de oxidação em função do logaritmo da velocidade de varredura.	74
Figura 20 - Voltamogramas de pulso diferencial de uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BPS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, obtidos em diferentes valores de amplitude de pulso, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, empregando o poly(Met)Co/GCE. Inserido: Gráfico da dependência da corrente de pico (I_p) com a amplitude de pulso.	75
Figura 21 - Voltamogramas de pulso diferencial de uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BPS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, obtidos em diferentes velocidades de varredura, $a = 60 \text{ mV}$, empregando o poly(Met)Co/GCE. Inserido: Gráfico da dependência da corrente de pico (I_p) com a velocidade de varredura.....	76
Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7$) pela oxidação do estriol em diferentes valores de concentrações: 0,00 (a), 0,596 (b), 0,695 (c), 0,794 (d), 0,990 (e), 1,96 (f), 2,91 (g), 3,85 (h), 4,76 (i), 5,66 (j), 6,54 (k), 7,41 (l) 8,26 (m) e $9,90 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (n) empregando o poly(Met)Co/GCE, com $a = 60 \text{ mV}$ e $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Gráfico inserido: Curva analítica (I_p vs [estriol]).	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Excreção diária (μg) de estrogênios por humanos.	36
Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas relevantes do estriol (E3)	37
Tabela 3 - Lista de reagentes com a procedência e a pureza.	56
Tabela 4 - Valores de corrente de pico anódica (I_{Pa}), corrente de pico anódica média ($I_{PaMédia}$) e desvio padrão relativo (DPR) das seis medidas realizadas no mesmo dia para as concentrações 3,0, 5,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol.	79
Tabela 5 - Valores de corrente de pico anódica (I_{Pa}), corrente de pico anódica média ($I_{PaMédia}$) e desvio padrão relativo (DPR) das medidas realizadas em seis dias diferentes para as concentrações 3,0, 5,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol.	79
Tabela 6 - Efeito de alguns possíveis compostos interferentes na determinação de estriol. [composto interferente adicionado] = 0,48 mmol L^{-1} , [E3] 4,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, n=3.	80
Tabela 7 - Resultados da determinação de estriol em comprimidos obtidos pelo método proposto e pelo método oficial	81
Tabela 8 - Teor médio de estriol determinado pelo método oficial e pelo método proposto e resultados dos testes t de Student e teste F	81
Tabela 9 - Resultados obtidos do teste de adição e recuperação em amostras de urina humana e comprimidos	82
Tabela 10 - Comparação de algumas características do método analítico proposto para determinação de estriol com características de outros métodos analíticos descritos na literatura.	84
Tabela 11: Parâmetros analíticos utilizados para validação do método proposto na determinação de estriol	86

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 –	$LOD = \frac{3 \times S_b}{b}$	47
Equação 2 –	$LOQ = \frac{10 \times S_b}{b}$	47
Equação 3 –	$I_{pa}(A) = 8,58 \times 10^{-7} + 2,31 \times 10^{-6} v^{1/2} (V s^{-1})^{1/2}$	66
Equação 4 –	$I_{pc}(A) = -6,99 \times 10^{-6} - 2,33 \times 10^{-6} v^{1/2} (V s^{-1})^{1/2}$	66
Equação 5 –	$I_p = \pm(2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C_0 v^{1/2}$	66
Equação 6 –	$A = \frac{I_p}{v^{1/2}} \times \frac{1}{2,686 \times 10^5 \times n^{3/2} \times D^{1/2} \times C_0}$	67
Equação 7 –	$E_{pa} = (0,988 \pm 0,008) - (0,058 \pm 9,57 \times 10^{-4}) pH$	71
Equação 8 –	$ E_p - E_{p/2} = 48 \text{ mV}/\alpha n$ (à 25°C)	71
Equação 9 –	$I_p (\mu A) = -3,012 \times 10^{-7} (\pm 1,489 \times 10^{-8}) + 0,836 (\pm 0,013) [E3]/(\mu mol L^{-1})$	78
Equação 10 –	$I_p (\mu A) = 2,293 \times 10^{-6} (\pm 1,743 \times 10^{-7}) + 0,253 (\pm 0,022) [E3]/(\mu mol L^{-1})$	78

-
-

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área eletroativa do eletrodo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b	Valor do coeficiente angular da curva analítica
BR	Britton-Robinson
CV	Voltametria cíclica, do inglês <i>cyclic voltametry</i>
D	Coeficiente de difusão
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
EMEA	<i>European Medicine Agency</i>
E_{pc}	Potencial de pico catódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
EQM	Eletrodos quimicamente modificados
FDA	<i>Food and Drug Agency</i>
GCE	Eletrodo de carbono vítreo, do inglês <i>Glassy carbono electrode</i>
DPV	Voltametria de pulso diferencial, do inglês <i>diferencial pulse voltammetry</i>
I	Corrente elétrica
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
I_p	Corrente de pico
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

LOD	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
Log	Logaritmo
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantification</i>
MHLW	<i>Ministry of Health, Labour and Welfare</i>
N	Número de elétrons transferidos no processo redox
pH	Potencial hidrogeniônico
Poly(Met)/CoGCE	Eletrodo de carbono vítreo eletropolimerizado com metionina e cobalto, do inglês <i>glassy carbon electrode modified electropolymerized with methionine and cobalt</i>
RDC	Resolução da diretoria colegiada
DPR	Desvio padrão relativo
Sb	Desvio padrão da média de 10 brancos
Σ	Desvio padrão absoluto
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
v	Velocidade de varredura
$v^{1/2}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura
V	Volts
Vis	Visível
\bar{x}	Média aritmética de um pequeno número de medições

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	33
3.1 Sistema endócrino.....	33
3.2 Hormônios sexuais femininos	34
3.2.1 Hormônios estrógenos	34
<i>3.2.1.1 Estriol.....</i>	<i>36</i>
3.3 Secreção de hormônios esteroides durante a gravidez.....	37
3.4 Terapia de reposição hormonal.....	38
3.5 Métodos analíticos para determinação do estriol	39
3.5.1 Determinação de estriol por métodos eletroquímicos	40
3.6 Validação do método analítico	42
3.6.1 Seletividade	44
3.6.2 Sensibilidade	44
3.6.3 Linearidade	44
3.6.4 Precisão.....	45
3.6.5 Exatidão.....	45
<i>3.6.5.1 Ensaios de recuperação.....</i>	<i>45</i>
<i>3.6.5.2 Adição de padrão</i>	<i>45</i>
<i>3.6.5.3 Materiais de referência certificados (CRM).....</i>	<i>46</i>
<i>3.6.5.4 Comparação de métodos.....</i>	<i>46</i>
3.6.6 Limite de detecção (LOD).....	46
3.6.7 Limite de quantificação (LOQ)	47
3.7 Técnicas Voltamétricas	47
3.7.1 Voltametria cíclica.....	48
3.7.2 Voltametria de pulso diferencial	49
3.7.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	50
3.8 Eletrodos quimicamente modificados.....	51

4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Equipamentos utilizados	55
4.1.1 Célula eletroquímica e eletrodos	55
4.1.2 Potenciostato	55
4.1.3 Espectrofotômetro	56
4.2 Reagentes e soluções	56
4.2.1 Reagentes	56
4.2.2 Soluções	57
4.2.2.1 <i>Solução tampão fosfato e Britton-Robinson (BR)</i>	57
4.2.2.2 <i>Solução estoque de estriol para determinação eletroquímica</i>	57
4.2.2.3 <i>Solução estoque da estriol para determinação espectrofotométrica</i>	57
4.2.2.4 <i>Preparo das amostras</i>	58
4.2.2.4.1 <i>Preparo da amostra de urina humana para determinação de estriol</i>	58
4.2.2.4.2 <i>Preparo da amostra de comprimidos contendo estriol para determinação eletroquímica</i>	58
4.2.2.4.3 <i>Preparo da amostra de comprimidos e determinação espectrofotométrica de estriol</i>	58
4.3 Metodologia	59
4.3.1 Determinação das quantidades de estriol presente em urina utilizando método eletroquímico	59
4.3.2 Determinação da quantidade de estriol presente em comprimidos utilizando método eletroquímico	59
4.3.3 Preparação do eletrodo de carbono vítreo modificado com polimetionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE)	60
4.3.3.1 <i>Determinação da área eletroativa do eletrodo de carbono vítreo modificado com metionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE)</i>	60
4.3.3.2 <i>Estudos de Impedância Eletroquímica</i>	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Escolha da modificação a ser utilizada no eletrodo de trabalho	61
5.2 Eletropolimerização da metionina e do cobalto sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo	62
5.3 Determinação da área eletroativa do eletrodo de carbono vítreo modificado com metionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE)	65
5.4 Estudos de Impedância Eletroquímica	67

5.5 Comportamento eletroquímico do estriol sobre a superfície do poly(Met)Co/GCE.	68
5.5.1 Perfil voltamétrico do estriol sobre a superfície do poly(Met)Co/GCE	68
5.5.2 Influência do pH do eletrólito suporte na oxidação eletroquímica do estriol sobre o poly(Met)Co/GCE.....	69
5.5.3 Escolha do eletrólito suporte	72
5.6 Estudos da influência da velocidade de varredura no perfil voltamétrico do estriol sobre a superfície do poly(Met)Co/GCE	73
5.7 Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial.....	75
5.7.1 Estudo da variação da amplitude de pulso.....	75
5.7.2 Estudo da variação da velocidade de varredura.....	76
5.8 Construção da curva analítica para a determinação de estriol.....	77
5.9 Estudos de repetibilidade intradia e interdia.....	79
5.10 Determinação de estriol em amostras reais.....	80
5.10.1 Estudos de interferentes	80
5.10.2 Determinação de estriol em um produto comercial farmacêutico	81
5.10.3 Análise estatística empregando teste t de Student e teste F	81
5.11 Testes de adição e recuperação	82
5.12 Comparações com outros métodos descritos para análise de estriol	83
5.13 Validação e considerações finais do método proposto para análise de estriol em formulações farmacêuticas	85
6 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A - TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO	99
ANEXO B - TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS	101

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios são substâncias químicas responsáveis por integrar a atividade de sistemas e subsistemas orgânicos. Possuem a capacidade de alterar a função celular em resposta a uma variação do meio externo, induzir a manutenção do trabalho celular e alterar o nível de atividade de tecidos e órgãos (GUYTON *et al.*, 2006).

Dentre os hormônios esteroides sexuais femininos destacam-se os estrogênios e a progesterona. Os principais estrogênios presentes no organismo feminino são estradiol, estrona e estriol. Em mulheres no estado não gravídico, os estrogênios são produzidos pelas células da granulosa dos ovários, durante a gravidez eles passam a ser produzidos pela placenta, ou, em casos específicos, podem ser sintetizados através da aromatização de androgênios nos tecidos periféricos (FONSECA *et al.*, 2004; NELSON; COX; CUCHILLO, 2009).

A menopausa pode ocorrer de forma natural ou ser induzida cirurgicamente. Nessa fase, a função ovariana diminui ou é extinta, conseqüentemente, os níveis de estrógenos caem drasticamente. Essa deficiência estrogênica que ocorre durante a menopausa leva a uma série de alterações fisiológicas e comportamentais. Dentre as alterações fisiológicas é possível citar as ondas de calor, os suores noturnos e a atrofia urogenital. As alterações patológicas mais comuns são a osteoporose e doenças cardiovasculares. Quanto às alterações comportamentais relatadas, temos a depressão, oscilações de humor, irritabilidade e insônia (MARTINS *et al.*, 2009; RICÓVERI, 2008; ZAHAR *et al.*, 2005).

Diante desta problemática, a terapia de reposição hormonal (TRH) surgiu com o propósito de aliviar os sintomas e agir de forma preventiva de maneira a reduzir o aparecimento de doenças, tais como as complicações cardiovasculares e a osteoporose. Normalmente, a TRH envolve a administração cíclica ou contínua de baixas doses de um ou mais estrógenos, podendo ou não ser associado a um progestágeno. Os estrógenos mais comumente usados na TRH são o estriol, estradiol e os estrógenos conjugados que podem ser administrados por via oral, vaginal (estriol), através de implantes subcutâneos (estradiol) ou através de discos transdérmicos (estradiol) (RANG *et al.*, 2012).

Comprimidos orais de estriol têm apresentado bons resultados, em especial, para o tratamento de problemas urogenitais locais em mulheres pós-menopáusicas. O estriol tem sido empregado no tratamento da menopausa há muito anos, com resultados satisfatórios. Isso se deve, principalmente, porque o fármaco não estimula o endométrio, logo, pode ser utilizado

sem interrupção e sem a adição de um progestágeno para proteger o endométrio (BRADLEY *et al.*, 1997; REYES-ROMERO, 2001; SANTOS *et al.*, 2010).

Durante o período gravídico, a excreção de estriol (E3) é cerca de mil vezes maior do que os níveis de não gestantes (KATZENELLENBOGEN, 1984). Considerando que a produção de estriol ocorre mediante reações fetais e placentárias, determinações de estriol na urina e no sangue podem ser úteis para o monitoramento da unidade feto-placentária, sendo um indicador do bem-estar fetal. O estriol em sua forma livre apresenta caráter hidrofóbico, mas é conjugado com sulfatos e glucuronídeos hidrossolúveis no fígado e depois excretado na urina. Após a excreção, essas formas conjugadas de estriol presentes na urina são rapidamente hidrolisadas, deixando o estriol na forma livre (GOEBELSMANN; JAFFE, 1971; YARON *et al.*, 1999).

Em meio a este contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes, sensíveis e práticos para a determinação de estriol em baixos níveis de concentração é muito importante. Os métodos oficiais para a análise de estriol em amostras farmacêuticas citados pela Farmacopeia Americana (USP 29), Farmacopeia Japonesa (JP XIV) e Farmacopeia Europeia, empregam, quase que exclusivamente, os métodos cromatográficos, tendo em vista que eles apresentam sensibilidade e seletividade satisfatórias na determinação de E3. Porém, esses métodos possuem limitações, tais como a necessidade de várias etapas de pré-tratamento de amostra (extração, derivatizações, dentre outras). Além disso, em técnicas como a cromatografia líquida (LC) ou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são produzidas altas quantidades de resíduos que contém solventes orgânicos tóxicos que exigem descarte especializado (CINCOTTO, 2016). Portanto, o desenvolvimento de métodos que sejam alternativos aos métodos cromatográficos tornando desnecessárias as etapas de tratamento de amostra e promovendo uma redução no consumo de solventes torna-se bastante relevante.

Nos últimos anos, os métodos eletroanalíticos surgiram como uma alternativa aos métodos oficiais de análise de estriol, tendo em vista que estas técnicas apresentam uma série de vantagens, como alta sensibilidade, alta frequência analítica, redução no consumo de solventes e de amostra, baixo custo e facilidade de operação.

Não obstante, no desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica alguns elementos devem ser levados em consideração. Por exemplo, um sensor eletroquímico deve ser construído de maneira que este detenha a maior sensibilidade, seletividade e robustez possível. Sendo assim, na área de desenvolvimento e construção de sensores eletroquímicos tem se tornado muito comum o uso de agentes modificadores, onde sua principal finalidade é

proporcionar um aumento na sensibilidade e na seletividade do sensor. Diversos grupos de pesquisa em todo mundo têm trabalhado na busca por novos materiais para modificação de eletrodos (CESARINO; CINCOTTO; MACHADO, 2015; FLOREA *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2016; HUANG; YUAN; HUANG, 2008; LI *et al.*, 2015). Dentre os materiais cujo número de estudos sobre sua aplicação como modificadores de eletrodos vem crescendo nos últimos anos, destacam-se os polímeros derivados de poliaminoácidos (FERRAZ; LEITE; MALAGUTTI, 2016a, 2016b; BERGAMINI; SANTOS; ZANONI, 2013; LI; LIU; WEI, 2011; LUO *et al.*, 2013; MA; SUN, 2007; SONG; YANG; HU, 2008). Alguns elementos, como por exemplo, os metais de transição, também estão sendo aplicados na modificação de eletrodos juntamente aos poliaminoácidos apresentando resultados excelentes (EMAMI; SHAMSIPUR; SABER, 2014; GU *et al.*, 2015; MUNA *et al.*, 2011; OJANI *et al.*, 2014; OJANI; ALINEZHAD; ABEDI, 2013). As propriedades de um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de polimetionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE) e sua aplicação na determinação de estriol em formulações farmacêuticas e urina serão discutidos neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Estudar as propriedades eletroquímicas do estriol e desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a determinação deste fármaco em formulações farmacêuticas e urina utilizando eletrodo de carbono vítreo (GC) quimicamente modificado com metionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE).

2.2 Objetivos específicos

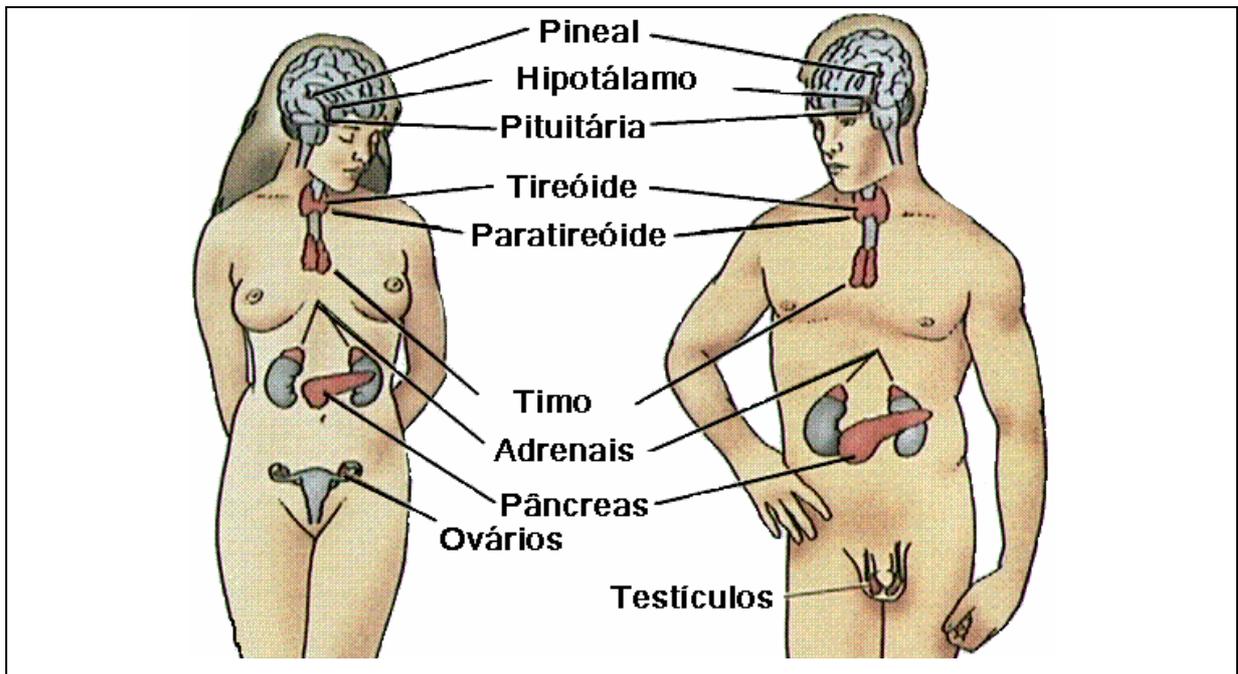
- ✓ Modificar um eletrodo de carbono vítreo utilizando metionina e cobalto;
- ✓ Estudar a resposta voltamétrica do estriol com o uso eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com metionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE) e verificar os efeitos do pH e de diferentes eletrólitos de suporte;
- ✓ Obter informações físico-químicas para as reações redox do estriol (como potencial redox, número de elétrons envolvidos, etc.);
- ✓ Otimizar os parâmetros da Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) como a amplitude de pulso e a velocidade de varredura para obter uma melhor sensibilidade e construir curvas analíticas para a determinação do estriol;
- ✓ Avaliar as figuras de mérito: seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), para a validação do método;
- ✓ Aplicar a metodologia desenvolvida na análise estriol em amostras de urina e em formulações farmacêuticas.
- ✓ Comparação entre os resultados obtidos pela metodologia eletroanalítica desenvolvida e o método espectrofotométrico na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis), procedimento recomendado pela farmacopeia americana (USP 29).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Sistema endócrino

O sistema endócrino é formado por um conjunto de glândulas localizadas em diversas partes do corpo, como por exemplo, as gônadas (ovários e testículos), a tireoide e as glândulas supra-renais (Figura 1), juntamente com hormônios por elas sintetizados, dentre eles a tiroxina, a adrenalina, os estrogênios, os progestagênios e a testosterona (GHISELLI; JARDIM, 2007). Ele regula, juntamente com o sistema nervoso, todas as funções fisiológicas do organismo. O sistema endócrino atua transportando informações através da circulação de hormônios pelos diferentes tecidos. Os hormônios produzidos influenciam as atividades funcionais de outras células. Essa influência pode possuir natureza excitadora ou inibidora dependendo do hormônio excretado (RAIMUNDO, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Figura 1 - O sistema endócrino humano



Fonte: FARABEE, 2001.

No corpo humano destacam-se algumas glândulas endócrinas. A glândula pineal, por exemplo, inibe a precocidade sexual. A pituitária, principal glândula do sistema endócrino, controla a ação de outras glândulas. A tireoide ajuda a controlar o metabolismo. As paratireoides, quatro pequenas glândulas localizadas no pescoço, distribuem o cálcio entre o sangue e os ossos. O timo, glândula associada ao sistema linfático, produz hormônios que

estão relacionados com a defesa contra infecções, formação de anticorpos e formação do sistema linfático; auxilia também no controle do crescimento e na maturação sexual. As glândulas adrenais, localizadas acima dos rins, regulam o nível do sal e da água e secretam estimulantes. O pâncreas atua como uma glândula exócrina e endócrina. Como exócrina produz sucos digestivos, ricos em enzimas, que fluem do canal pancreático para o intestino delgado, atuando na digestão dos alimentos. Já como endócrina produz hormônios que fluem diretamente para a corrente sanguínea. As glândulas sexuais governam a reprodução e as características sexuais secundárias (VON BRANDIS, 1977; RAIMUNDO, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007).

3.2 Hormônios sexuais femininos

Os ovários produzem os hormônios sexuais femininos, dentre os quais os principais são os estrogênios e a progesterona. Estes, por sua vez, são os responsáveis pelo desenvolvimento dos caracteres femininos, influenciando no crescimento dos órgãos reprodutivos. Também regulam a ovulação, a menstruação e garantem a manutenção da gravidez. Outros dois hormônios produzidos pela hipófise (pituitária) também agem na regulação dos processos reprodutivos: o hormônio estimulador do folículo (FSH) e o hormônio luteizante (LH). Esses hormônios, juntamente com os estrogênios e a progesterona, controlam o ciclo menstrual (GHISELLI; JARDIM, 2007).

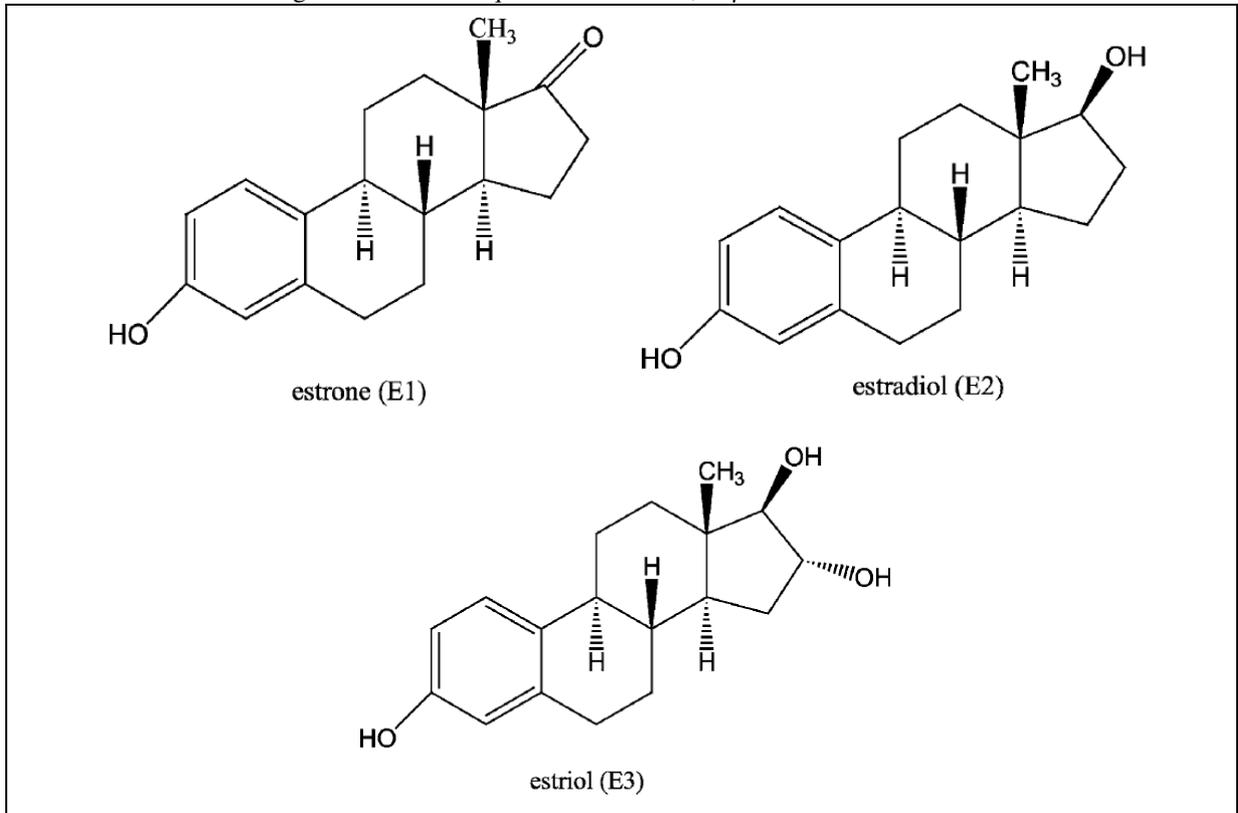
3.2.1 Hormônios estrógenos

Estrona, estradiol e estriol são os três mais importantes estrógenos produzidos no corpo humano. Devido às suas respectivas posições na sequência da biossíntese, a estrona é citada como E1, o estradiol como E2 e o estriol como E3. O estradiol é o principal estrogênio secretado pelo ovário. A síntese da estrona ocorre em sua maior parte nos tecidos periféricos, mas, também pode ser secretada pelo ovário. O estriol é um estrógeno fraco, resultante da conversão do estradiol e da estrona. A potência estrogênica do estradiol é 12 vezes maior que a da estrona e 80 vezes maior que a do estriol (GUYTON *et al.*, 2006).

Os hormônios esteroides possuem uma estrutura química semelhante à do colesterol, sendo sintetizados, principalmente, a partir do mesmo. São lipossolúveis e possuem em comum uma estrutura constituída de três anéis hexagonais e um anel pentagonal. Caracterizam-se por seu anel fenólico, o qual tem um grupamento hidroxila responsável por

sua atividade biológica, ou seja, pela atividade estrogênica (GUYTON *et al.*, 2006; FERREIRA, 2008; GHISELLI; JARDIM, 2007). A estrutura química da estrona, 17 β -estradiol e do estriol é apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da estrona, 17 β -estradiol e do estriol



Fonte: YING *et al.*, 2002.

Todos os hormônios esteróides exercem sua ação pela passagem através da membrana plasmática e ligação aos receptores intracelulares. Tanto em humanos quanto em animais, os estrógenos são metabolizados principalmente no fígado, onde passam por várias transformações. O 17 β -estradiol é oxidado rapidamente em estrona, que, por sua vez, pode sofrer outra biotransformação, sendo convertida em estriol e epiestriol. Esses metabólitos sofrem conjugação com sulfatos e glicuronatos, tornando-se altamente hidrossolúveis e facilmente excretados pelos rins. Aproximadamente, 50% dos estrógenos são excretados na urina durante as primeiras 24 horas após a administração. A outra parte é inicialmente eliminada pela bile, sofrendo hidrólise no intestino, onde a maior parte (cerca de 80%) é reabsorvida. Quando retornam ao fígado, podem ser reconjugados e excretados na bile ou na urina; ou podem escapar da reconjugação e entrar na corrente sanguínea novamente. Apenas

10% dos estrógenos são eliminados nas fezes (ARAÚJO JÚNIOR, N. L. C.; ATHANAZIO, 2007; YING; KOOKANA; RU, 2002).

Os estrogênios são excretados pelo corpo principalmente como formas conjugadas (sulfatos e glicuronatos), que são formas biologicamente inativas, solúveis em água. Após a excreção, estes conjugados são rapidamente hidrolisados, formando hormônios livres e seus metabólitos (GHISELLI; JARDIM, 2007; LÓPEZ DE ALDA *et al.*, 2002). Baseando-se em estudos anteriores sobre a excreção de estrógenos por humanos, Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000) estimaram a excreção diária de estrógenos oriunda de mulheres e homens (Tabela 1).

Tabela 1 - Excreção diária (μg) de estrogênios por humanos.

Categoria	17β-E2	E1	E3
Homens	1,6	3,9	1,5
Mulheres menstruadas	3,5	8	4,8
Mulheres na menopausa	2,3	4	1
Mulheres grávidas	259	600	6000

Fonte: JOHNSON, BELFROID e DI CORCIA, 2000. Adaptado.

No que diz respeito aos estrógenos, uma de suas principais aplicações medicinais tem sido o desenvolvimento de pílulas contraceptivas desde 1960. Além da contracepção, os estrógenos também são utilizados para outras finalidades na medicina humana, como no tratamento de câncer de mama em mulheres pós-menopausa, no tratamento de câncer de próstata, no tratamento de reposição hormonal na menopausa e na síndrome pós-menopausa, na terapia de substituição fisiológica em estados de deficiência hormonal. Já no manejo animal, eles são aplicados como promotores de crescimento (BEAUSSE, 2004).

3.2.1.1 Estriol

O estriol [1,3,5 (10)-estratrieno-3,16a, 17p-triol], fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3$, é um sólido cristalino branco, inodoro, com massa molecular de 288,38 g/mol. Sua estrutura química pode ser vista na Figura 2. Tem ponto de fusão na faixa de 284-285 °C e solubilidade de 0,5 mg/ml em água à 25 °C, sendo insolúvel em água fria e quente (KUMAR; MOHAN; SARMA, 2009).

Possui ação rápida e, portanto, têm sido prescrito há muitos anos como um agente terapêutico para o tratamento de mulheres na pós-menopausa e mulheres com doenças urogenitais. É comumente utilizado como uma alternativa ao estradiol, à estrona ou a uma

combinação dos dois no tratamento dos sintomas da menopausa. Conforme visto anteriormente, é possível obter o estriol por meio do metabolismo do estradiol e da estrona, advindas do ovário (TORRES, 2009; KUMAR; MOHAN; SARMA, 2009).

O estriol apresenta baixa pressão de vapor ($6,7 \times 10^{-15}$ mm Hg) o que indica a baixa volatilidade deste composto. O valor do coeficiente de partição octanol-água (Log K_{ow}) do esteroide natural E3 é 2,81. Logo, trata-se de um composto orgânico hidrofóbico e de baixa volatilidade. A Tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas relevantes do estrogênio natural estriol.

Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas relevantes do estriol (E3)

Hormônio	Sigla	log K_{ow} *	Pressão de vapor (mmHg)	Solubilidade em água (mg L^{-1} à 20 °C)	PM (g mol^{-1})	pKa
Estriol	E3	2,81	$6,7 \times 10^{-15}$	0,5	288,39	10,4

Fonte: GHISELLI e JARDIM, 2006; KUMAR, MOHAN e SARMA, 2009; BODZEK e DUDZIAK, 2006. Adaptado.

* Coeficiente de partição octanol-água

3.3 Secreção de hormônios esteroides durante a gravidez

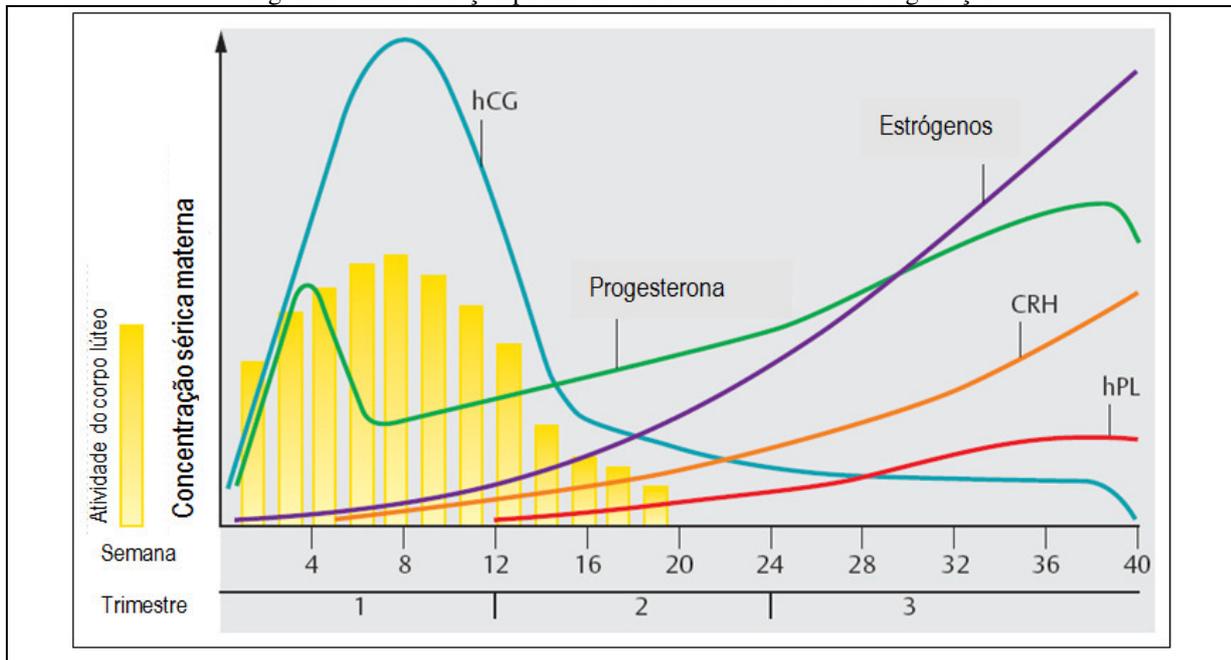
Em um estado não gravídico, o 17β -estradiol e a estrona são produzidos pelos ovários em quantidades 100 a 200 microgramas/dia. Nesse estado, o estriol é somente um subproduto do metabolismo da estrona, encontrado em quantidades pouco significativas. Contudo, durante a gravidez, a placenta torna-se a principal fonte de estrógenos e o estriol passa a ser produzido em maior quantidade, na faixa de miligramas, enquanto que a estrona e o estradiol continuam sendo produzidos em microgramas. A partir do terceiro trimestre, a placenta também passa a ser a principal fonte de progesterona (produzindo entre 300 e 400 miligramas/dia). Sendo assim, juntos, a progesterona e o estriol são os principais esteroides sexuais presentes durante a gravidez (SPEROFF, 2005; LAURIA-PIRES, 2008)

O estriol é detectado quando é iniciada a secreção do precursor pela glândula adrenal fetal. O E3 é o primeiro a ser detectado, durante a 9ª semana de gestação. As concentrações de estriol estabilizam entre a 31ª e a 35ª semanas e depois aumentam novamente nas 35ª e 36ª semanas (SPEROFF, 2005).

Durante o período de gravidez, a estrona e estradiol são secretados em quantidade cerca de cem vezes maior do que os níveis de não gestantes. Contudo, o aumento na excreção de estriol materno é de aproximadamente mil vezes. Não se fundamenta mais a ideia de que o estriol durante a gravidez é um metabólito estrogênico fraco, uma vez que ele é secretado em

altas concentrações e assim é capaz de produzir uma resposta biológica equivalente à do estradiol (KATZENELLENBOGEN, 1984). Devido à sua elevada taxa de produção e concentração, o estriol é um hormônio importante na gravidez. O nível de estradiol materno é maior do que o fetal, em contraste, o nível de estriol no feto é maior do que na mãe (SPEROFF, 2005). Em virtude dos dados citados, é possível afirmar que a gravidez humana é, portanto, caracterizada por um estado de hiperestrogenismo, onde as concentrações de estrógenos na circulação materna aumentam com o avançar da idade gestacional (Figura 3).

Figura 3 - Concentração plasmática dos hormônios durante a gestação



Fonte: DESPOPOULOS e SILBERNAGL, 2003.

Durante o período gestacional, a produção de estrogênios está principalmente sob o controle do feto sendo este, portanto, um método fundamental de sinalização, por meio do qual o feto induz processos fisiológicos que afetam o seu bem-estar. Estrógenos aumentam a neovascularização da placenta, melhoram o fluxo sanguíneo útero-placentário, logo, facilitam a troca gasosa e de nutrientes essenciais ao desenvolvimento do feto. Além disso, influenciam na função da glândula adrenal fetal, na produção de progesterona, além de atuar no preparo da glândula mamária para a lactação (PEPE; ALBRECHT, 1995; LAURIA-PIRES, 2008).

3.4 Terapia de reposição hormonal

A menopausa pode ser definida como uma cessação da menstruação que, por sua vez, pode resultar da perda da função ovariana, seja ela de maneira natural ou cirúrgica ou

mesmo como resultado de alguma intervenção médica. De maneira fisiológica, em uma mulher na faixa de 40 e 50 anos, a progesterona deixa de ser sintetizada e o primeiro sintoma é a irregularidade menstrual. Este momento, onde há somente a falta de progesterona, é chamado de climatério ou pré-menopausa. Entretanto, com o decorrer dos anos, os estrogênios também deixam de ser sintetizados. A menopausa é caracterizada pela ausência desses hormônios, que conseqüentemente, levam a uma variedade de sintomas que afetam negativamente a qualidade de vida das mulheres (FILES; KO; PRUTHI, 2011; PEREIRA, 2013). Os sintomas da menopausa decorrem principalmente devido aos níveis baixos de estrogênio, dentre os quais pode-se citar: os calores; alterações na pele; sintomas urinários; ressecamento vaginal; alterações de libido; insônia, irritabilidade, ansiedade, dentre outros (CHERVENAK, 2009).

Como se trata de um evento natural, a menopausa não pode ser impedida. Não obstante, existem alternativas, tais como dieta, exercícios físicos e tratamento medicamentoso que visam aliviar alguns sintomas da menopausa. O tratamento mais comum é a terapia de reposição hormonal (TRH) ou terapia de reposição de estrogênio (TRE). Esta terapia é eficaz para os sintomas associados com a menopausa, entretanto, existe o risco de efeitos colaterais. Normalmente, a TRH envolve a administração de quantidades pequenas de estrogênio, ou uma combinação de estrogênio e progesterona. As principais indicações da terapia de reposição hormonal são: conservação do trofismo vaginal; preservação do osso e da pele; e melhora da sexualidade (PEREIRA, 2013).

Os estrógenos comerciais utilizados para a terapia encontram-se disponíveis em diversas formas farmacêuticas para aplicação por diversas vias, tais como oral, transvaginal (cremes, comprimidos e anéis), transdérmica (géis, cremes e *patches*) e implantes subcutâneos (PATTIMAKIEL; THACKER, 2011). No Brasil, encontram-se disponíveis na forma de comprimidos isolados, o Estrofem[®] e Natifa[®] contendo estradiol, e Ovestrion[®], contendo estriol (ANVISA, 2017).

3.5 Métodos analíticos para determinação do estriol

Nos fluidos corporais, o estriol (E3) existe nas formas conjugadas como sulfato ou glucuronato. Apenas uma pequena fração do estriol total se apresenta como E3 não-conjugado (uE3). Comumente, são realizadas dosagens de uE3, α -fetoproteína (AFP) e subunidade β da gonadotropina coriônica humana (β -hCG) no soro de mulheres no segundo trimestre da

gestação com o propósito de rastrear/avaliar probabilidades de fetos com defeito no tubo neural ou aneuploidias, como por exemplo, a Trissomia 21 (síndrome de Down). Os imunoenaios são os principais métodos de avaliação das concentrações de uE3 nos fluidos corporais (HUANG *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2010; VIEIRA-NETO, E.; ZINGONI, L. F.; FONSECA, 1999). Entre os métodos de imunoensaio foram reportados trabalhos que tratam de um imunoensaio enzimático (EIA) e de um radioimunoensaio (RIA) (GUO-JIN *et al.*, 2011; XUE *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2006) para a quantificação de estriol. Alguns métodos utilizando espectrometria de massa também foram desenvolvidos (XU *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2008) e o método de Siekmann usando GC-MS tem sido considerado como um método de referência para a quantificação de E3 (SIEKMANN, 1979). Porém, estes métodos não são comumente usados em testes clínicos de rotina devido ao alto custo da instrumentação e ao requisito de operadores altamente qualificados. Assim, surgiram outras propostas de métodos para a quantificação do estriol usando, por exemplo, a eletroforese (FLOR *et al.*, 2010; FONSECA; LIMA; ESTEVES, 2011) e também várias técnicas cromatográficas (LU *et al.*, 2012; ANDRÁSI *et al.*, 2011; GORGA *et al.*, 2014; PIWOWARSKA; RADOWICKI; PACHECKA, 2010; LISBOA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2008). Além destes trabalhos citados, os níveis de estriol na urina, soro e líquido amniótico foram medidos por HPLC usando diferentes tipos de detectores, incluindo UV (WANG *et al.*, 2008) e eletroquímico (TAGAWA *et al.*, 1999).

No entanto, a maioria dos métodos citados requer etapas de preparação de amostras, como, por exemplo, hidrólise enzimática, extração a partir de fluidos biológicos e derivatização. Tais procedimentos são tediosos, demandam muito tempo, tornando as análises demoradas, além do alto custo dos equipamentos. Nos imunoenaios, é preciso obter um anticorpo específico para o estriol. As análises por RIA são atualmente o método de escolha para as análises de rotina do estriol. Não obstante, este método seja confiável e sensível, há uma série de desvantagens relacionadas com o uso de radioisótopos, tais como, a eliminação de resíduos radioativos e a sua utilização está restrita a institutos autorizados a manusear radioisótopos, além do custo dos fluídos de cintilação (SANTOS *et al.*, 2010).

3.5.1 Determinação de estriol por métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos no campo da análise farmacêutica têm se desenvolvido muito nos últimos anos, devido à sua simplicidade, razoável exatidão e precisão, baixo custo e rapidez. Além disso, são métodos que não apresentam a necessidade

de derivatização ou etapas de extração demoradas de amostra em comparação com outras técnicas, porque os métodos eletroanalíticos são menos sensíveis aos efeitos da matriz. Ainda, como características adicionais, os métodos eletroquímicos têm outras vantagens como a seletividade, devido ao processo redox de um fármaco ocorrer em um eletrodo de trabalho feito a partir de um material apropriado, e a especificidade, devido à reação redox do fármaco de interesse, ocorrer num potencial aplicado específico e característico da espécie em análise, de forma que o analito pode ser facilmente identificado por seu potencial de pico voltamétrico (GUPTA *et al.*, 2011). Devido a todas estas características, os métodos eletroquímicos vêm cada vez mais despertando o interesse de vários pesquisadores pelo mundo.

A utilização de métodos eletroquímicos voltamétricos de pulso, tais como a voltametria de pulso diferencial (DPV) ou a voltametria de onda quadrada (SWV), apresentam grande sensibilidade e baixo limite de detecção devido à baixa corrente de fundo, permitindo assim determinar traços de moléculas eletroativas presentes em diferentes matrizes biológicas e ambientais com o uso de vários tipos de eletrodos (DA SILVA *et al.*, 2015; FERRAZ *et al.*, 2016; GUPTA *et al.*, 2011). No entanto, na análise voltamétrica de fármacos em matrizes biológicas tais como sangue, plasma ou soro e urina, estes analitos estão presentes juntamente com alta concentração de biomoléculas eletroativas, que interferem umas com as outras. Neste caso, a determinação de fármacos utilizando métodos voltamétricos pode ser melhorada usando eletrodos modificados que possibilitam um aumento na sensibilidade e seletividade do método eletroquímico (BEITOLLAHI *et al.*, 2012; BEITOLLAHI; MOSTAFAVI, 2014; FERRAZ; LEITE; MALAGUTTI, 2016b).

No geral, a seleção do material para a modificação do eletrodo é um dos fatores de grande importância na construção de um sensor eletroquímico. Os metais de transição com sua capacidade catalítica e excelente condutividade tornaram-se uma das escolhas importantes como materiais modificadores de eletrodo para aplicação na determinação de fármacos (BEITOLLAHI; SHEIKHSHOAIE, 2011a, 2011b; PANG *et al.*, 2015).

Alguns estudos utilizando métodos eletroquímicos para a determinação do hormônio estriol com a utilização de diferentes eletrodos já foram relatados na literatura. Cincotto e colaboradores (2015) desenvolveram uma metodologia eletroanalítica para determinação do hormônio estriol usando a amperometria e um eletrodo de carbono vítreo revestido com um material híbrido consistindo de folhas de grafeno dopadas com uma película fina de Sb_2O_5 . A determinação do estriol foi realizada na faixa de concentração de

$2,5 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, e os autores obtiveram um limite de detecção de $1,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado com sucesso para determinar o estriol em amostras de urina.

Santos e colaboradores (2010) desenvolveram uma metodologia eletroanalítica para determinação do hormônio estriol em amostras de urina e formulações farmacêuticas usando um eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada (SWV). Neste trabalho os autores reportaram um limite de detecção de $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e um limite de quantificação $8,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Vega e colaboradores (2007) desenvolveram uma metodologia por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono para a detecção amperométrica de compostos fenólicos estrogênicos, dentre eles o estriol. A determinação do estriol foi obtida na faixa de concentração de 1,0 a 100 μmol L⁻¹ com um limite de detecção de 0,340 μmol L⁻¹. O método foi aplicado com sucesso para determinar o estriol em amostra de água da torneira.

Lin e Li (2006) desenvolveram uma metodologia eletroanalítica para determinação do hormônio estriol usando a voltametria de onda quadrada e um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e *nanoclusters de Pt*. A determinação do estriol foi obtida na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ a $7,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $6,21 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O método foi aplicado com sucesso para determinar o estriol em soro sanguíneo.

Jin e Lin (2005) desenvolveram uma metodologia utilizando um eletrodo de grafite modificado com carbamilcolina aderida em parafina com a finalidade de determinar simultaneamente os estrógenos 17β-estradiol, estrona e estriol. Os picos de oxidação para as três substâncias foram encontrados no potencial de +0,55V *versus* o eletrodo de calomelano saturado (SCE). Diante disto, a concentração determinada foi denominada estrógenos totais. Para calcular as concentrações individuais de cada hormônio, foi realizada uma relação típica de 17β-estradiol:estrona:estriol que foi de 2:2:1. A faixa linear de concentração relacionada à determinação de estriol foi de 5×10^{-7} a 9×10^{-6} mol L⁻¹. O método foi aplicado na determinação de hormônios em soro sanguíneo de mulheres gestantes.

3.6 Validação do método analítico

A qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos em seu processamento são parâmetros fundamentais quando se busca o bom desempenho de qualquer técnica analítica. Estabelecer limites para estes parâmetros através

da estimativa das figuras de mérito é uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório. Essa etapa é conhecida como validação (FERREIRA *et al.*, 2008).

Existem duas formas para se realizar a validação um método. A primeira delas é conduzida somente em um laboratório, também chamada de validação intralaboratorial. Neste caso são avaliados parâmetros como seletividade, linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão. A segunda forma envolve estudos interlaboratoriais, que avaliam além dos parâmetros já descritos, outros como a reprodutibilidade e a incerteza de medição da metodologia. Neste último caso, o estudo recebe o nome de validação completa, sendo exigido por órgãos reguladores para a adoção de um método como oficial ou padrão (MIRANDA *et al.*, 2015; RIBANI *et al.*, 2004).

Com o desenvolvimento da química medicinal e o surgimento de novos fármacos em âmbito mundial, a harmonização de critérios para o registro desses novos produtos pelos órgãos reguladores tornou-se imprescindível. Nesse sentido, a IUPAC “*International Union of Pure and Applied Chemistry*” publicou um guia para calibração em Química Analítica. As agências regulatórias da União Européia EMEA, “*European Medicine Agency*”, dos Estados Unidos “*FDA, Food and Drug Agency*” e do Japão MHLW, “*Ministry of Health, Labour and Welfare*” passaram a organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização ICH, “*International Conference on Harmonisation*”, buscando estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) regulamentam a validação de métodos analíticos no Brasil. Em 2003, a ANVISA publicou a resolução 899/2003, onde apresenta um guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos aplicados a formulações farmacêuticas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2015).

Os métodos eletroanalíticos surgem como uma alternativa viável para a análise sensível de compostos farmacologicamente ativos em formulações farmacêuticas ou em amostras biológicas, tais como plasma e urina. A validação do método eletroanalítico é um processo utilizado com o propósito de comprovar que o procedimento de determinação utilizado para um teste específico é adequado para o uso pretendido. Portanto, ela serve para avaliar a aplicabilidade, confiabilidade, qualidade, precisão e consistência dos resultados analíticos (GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

Os métodos eletroanalíticos precisam ser validados ou revalidados sempre que:

1. Quando um novo procedimento eletroanalítico está sendo desenvolvido;
2. Antes de sua introdução em uso rotineiro;
3. Sempre que as condições mudam (parâmetros do equipamento, amostras ou matriz) para os quais a técnica foi validada;
4. Sempre que o método ou quaisquer parâmetros (concentração da solução, pH, força iônica, etc.) são alterados e estas alterações estão fora do âmbito original da técnica eletroanalítica;
5. Quando um determinado procedimento eletroanalítico vai ser usado em outro laboratório;
6. Quando as medições serão realizadas por outra pessoa (GUMUSTAS; OZKAN, 2011, p. 1, tradução nossa).

3.6.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade do método de aferir os compostos de interesse com exatidão, mesmo em presença de impurezas, produtos de degradação, ou qualquer outro componente. A farmacopeia americana define que um método é seletivo quando ele possui a capacidade de medir, de forma exata, um analito na presença de interferências, as quais se espera que estejam presentes na matriz da amostra (ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004).

3.6.2 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade que determinado método analítico tem de distinguir duas concentrações diferentes. Ela pode ser determinada pela inclinação da curva de calibração. Em outras palavras, a sensibilidade é um parâmetro que descreve o quanto a resposta muda na proporção que a concentração do analito de trabalho muda. Ela depende das características do analito e da técnica eletroanalítica empregada (GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

3.6.3 Linearidade

Trata-se de um parâmetro importante para os métodos de determinação quantitativa. Um estudo de linearidade verifica se a resposta é linearmente proporcional à concentração do analito na faixa de concentração das soluções da amostra, ou seja, a linearidade de um método eletroanalítico é a medida de quão bem o gráfico de calibração da resposta eletroanalítica *versus* a concentração se aproxima de uma linha reta (GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

3.6.4 Precisão

A precisão descreve o grau de concordância entre os resultados de uma série de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a amostras múltiplas de uma mesma amostra. A precisão depende apenas da distribuição de erros aleatórios, não se relacionando com o valor verdadeiro. Normalmente, é expressa como desvio padrão relativo da análise de repetição. Assim, em termos numéricos, um grande desvio padrão relativo para a precisão indica que os resultados estão dispersos e isso significa que a precisão é ruim (ANVISA, 2013; GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

3.6.5 Exatidão

A exatidão é a principal exigência dos métodos eletroanalíticos. Trata-se da proximidade entre o valor acordado que é adotado (valor de referência convencional, verdadeiro ou aceito) e o valor encontrado. Também é definida como o grau de concordância entre uma medida obtida e o valor verdadeiro ou esperado. É afetada por componentes de erro sistemáticos e aleatórios (GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

A exatidão pode ser averiguada através da comparação de um método proposto com um método de referência, pela realização de ensaios de recuperação na matriz, pelo uso de materiais de referência e por adição de padrão.

3.6.5.1 Ensaios de recuperação

Nestes ensaios, o padrão de referência do analito deve ser adicionado a um meio de matriz em branco, comparando-se com os resultados analíticos das amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), considerando a faixa de linearidade do método. Por meio desta técnica, as possíveis interferências e efeitos potenciais entre os componentes inativos e o composto farmacologicamente ativo podem ser investigadas (ANVISA, 2003; GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

3.6.5.2 Adição de padrão

A técnica de adição de padrão deve ser escolhida para o teste de exatidão quando não houver matriz em branco disponível. Neste teste, uma quantidade conhecida de padrão é

adicionada em diferentes níveis em uma matriz de amostra que já contém alguma quantidade do composto investigado. A diferença entre os resultados das amostras dopadas e não dopadas, é a parte recuperada do analito adicionado, que, por sua vez, pode ser comparada com a quantidade conhecida adicionada (GUMUSTAS; OZKAN, 2011).

3.6.5.3 Materiais de referência certificados (CRM)

Na validação dos métodos, devem ser usados materiais de referência ou padrões analíticos acompanhados de um certificado garantindo a concentração da substância (RIBANI et al., 2004).

3.6.5.4 Comparação de métodos

Outra forma de avaliar a exatidão de um método é realizar a análise através de dois métodos independentes. O método de referência (definido na farmacopeia) selecionado pode, em princípio, ser utilizado para testar o viés de outro método sob validação. Assim, se os resultados obtidos pelo método eletroanalítico proposto e o método de referência concordarem, tem-se uma boa evidência de que ambos funcionam para o composto estudado. Para obter a exatidão por meio destes desses resultados, os testes t de Student e F são geralmente utilizados como métodos de comparação estatística (GUMUSTAS; OZKAN, 2011; RIBANI et al., 2004).

3.6.6 Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD) é a quantidade mais baixa do composto investigado numa amostra que pode ser detectada, contudo, não necessariamente quantificada com uma incerteza aceitável. Métodos com baixo limite de detecção são necessários para rastrear compostos ativos em produtos farmacêuticos e/ou amostras biológicas, para detectar impurezas residuais, produtos de degradação em formas farmacêuticas acabadas ou metabólitos de fármacos em amostras biológicas (GUMUSTAS; OZKAN, 2011). O limite de detecção (LOD) pode ser expresso pela equação 1 como:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{b} \quad (1)$$

Temos que S_b é a estimativa do desvio padrão da resposta. Ele pode ser a estimativa do desvio padrão do branco ou do coeficiente linear da equação. Já o termo b é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica. Para obter estes dados, uma curva analítica deverá ser construída utilizando a matriz contendo o analito de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

3.6.7 Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ) é a concentração mais baixa de composto que pode ser medido na matriz da amostra a um nível aceitável de exatidão e precisão. O LOQ para cada composto pode ser determinado utilizando o primeiro nível de concentração da curva analítica (INMETRO, 2007; GUMUSTAS; OZKAN, 2011). O limite de quantificação pode ser expresso pela equação 2:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_b}{b} \quad (2)$$

As variáveis S_b e b assumem os mesmos significados para o cálculo do limite de detecção.

3.7 Técnicas Voltamétricas

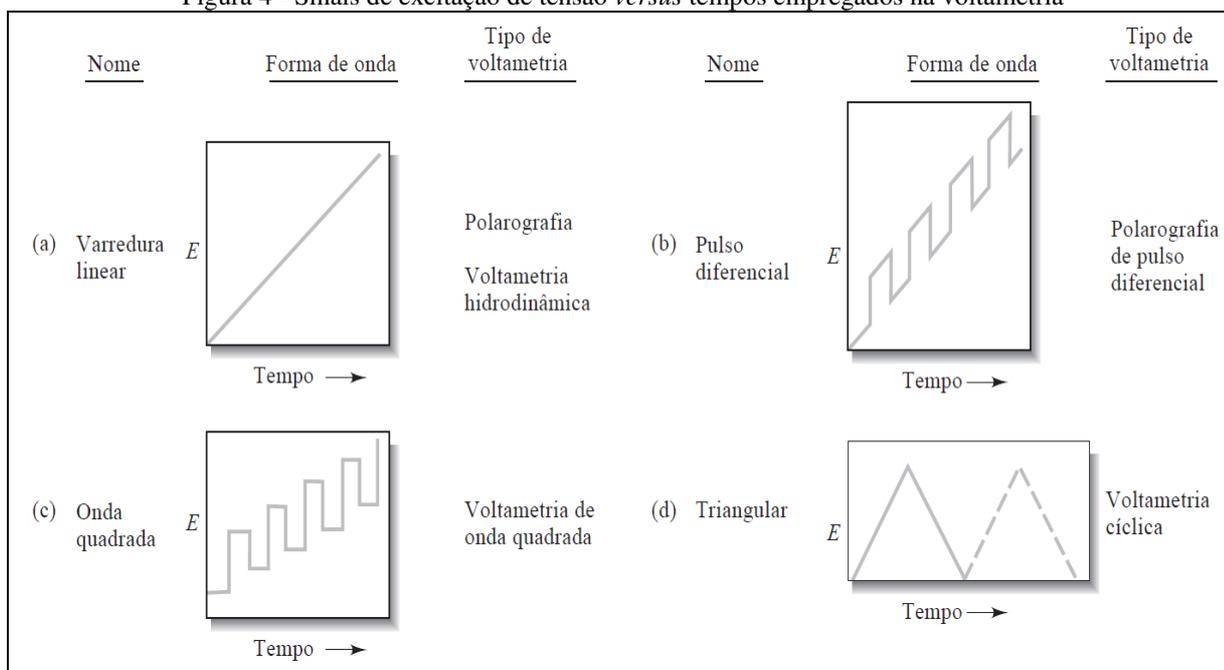
Os métodos eletroanalíticos onde as informações a respeito de um analito de interesse são obtidas por meio da medida de corrente em função de um potencial aplicado sob condições que promovem a polarização do eletrodo de trabalho, são chamados de métodos voltamétricos (PACHECO *et al.*, 2013).

As medidas voltamétricas baseiam-se na medida da corrente em uma célula eletroquímica sob condições de completa polarização de concentração, onde a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo (SKOOG *et al.*, 2013).

São amplamente empregadas para estudos fundamentais sobre processos de oxidação e redução em vários meios, processos de adsorção e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies modificadas de eletrodos (SILVA, 1998; SKOOG *et al.*, 2013).

Para que seja possível determinar um analito por voltametria é imprescindível que o mesmo seja eletroativo. Portanto, é necessário que ele oxide ou reduza em uma região de potencial aplicado onde a transferência de elétrons seja favorável termodinamicamente ou cineticamente, criando-se assim um fluxo de elétrons (WANG, 1994).

Figura 4 - Sinais de excitação de tensão *versus* tempos empregados na voltametria



Fonte: SKOOG , 2013, p. 629.

Nas técnicas voltamétricas, enquanto a resposta de corrente é medida, a voltagem no eletrodo de trabalho varia sistematicamente. Várias funções voltagem-tempo (que também são chamadas de sinais de excitação) podem ser aplicadas ao eletrodo. A varredura linear é a mais simples delas. Nela, o potencial no eletrodo de trabalho muda linearmente com o tempo. Existem outras formas de onda que podem ser aplicadas, tais como as ondas pulsadas e triangulares (SKOOG *et al*, 2013).

A figura 4 mostra as formas de onda de quatro dos sinais de excitação mais comuns empregados na voltametria. As técnicas voltamétricas utilizadas neste trabalho são a voltametria de pulso diferencial e a voltametria cíclica. Portanto, essas técnicas serão discutidas a seguir.

3.7.1 Voltametria cíclica

Essa técnica é comumente utilizada por pesquisadores para a aquisição de informações qualitativas sobre as reações eletroquímicas. Isso se deve à capacidade que a

voltametria cíclica (VC) tem de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, sobre reações químicas acopladas ou processos adsortivos (PACHECO *et al*, 2013). Também é útil na detecção de intermediários de reação, na observação e no acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos (SKOOG *et al.*, 2013).

Na maioria das vezes, a voltametria cíclica é primeira técnica utilizada no desenvolvimento de um método eletroquímico, pois oferece uma localização rápida do potencial redox das espécies eletroativas e além de informações sobre o efeito do meio no processo redox.

Alguns dados importantes são fornecidos pela voltametria cíclica, tais como o potencial de pico catódico (E_{pc}), o potencial de pico anódico (E_{pa}), a corrente de pico catódico (I_{pc}) e a corrente de pico anódico (I_{pa}).

Para reações reversíveis de eletrodo, as correntes de pico anódica e catódica são aproximadamente iguais em valores absolutos, mas com sinais opostos. Em reações irreversíveis, para um processo de redução, à medida que o potencial é varrido no sentido reverso, não ocorre a oxidação do analito. Em sistemas quasi-reversíveis, para um processo de redução, a oxidação do analito na varredura reversa é menos pronunciada do que em processos reversíveis, também existe uma grande diferença entre os potenciais de pico catódicos e anódicos (SKOOG *et al*, 2006).

Existem dois componentes principais que determinam as reações que ocorrem em um eletrodo: a transferência heterogênea de carga entre analito e eletrodo; e a transferência de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo. Cada tipo de voltamograma gerado depende do mecanismo da reação redox do composto que ocorre na superfície do eletrodo. Este fato faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos (BARD e FAULKNER, 1980; PACHECO *et al*, 2013).

3.7.2 Voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial (DPV), pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo (Figura 4b). Nesta técnica, dois valores de corrente são obtidos de forma alternada. A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada *versus* o potencial aplicado. A curva diferencial resultante consiste em picos cuja altura é proporcional à concentração do analito (PACHECO *et al*, 2013).

O objetivo de realizar as medidas dessa forma é fazer a correção da corrente capacitiva, pois à medida que se aplica o pulso, ocorre um aumento da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradaica, contudo, a corrente capacitiva diminui de forma exponencial, ao passo que a corrente faradaica diminui linearmente. Portanto, escolhendo um tempo apropriado para se fazer a segunda leitura, é possível realizar uma leitura da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva é mínima e pode ser desconsiderada. Ao desvincular o valor da primeira leitura de corrente da segunda leitura, obtém-se uma minimização da contribuição da corrente de fundo e isso é o que permite o modo de pulso diferencial obter baixos limites de detecção (PACHECO *et al.*, 2013).

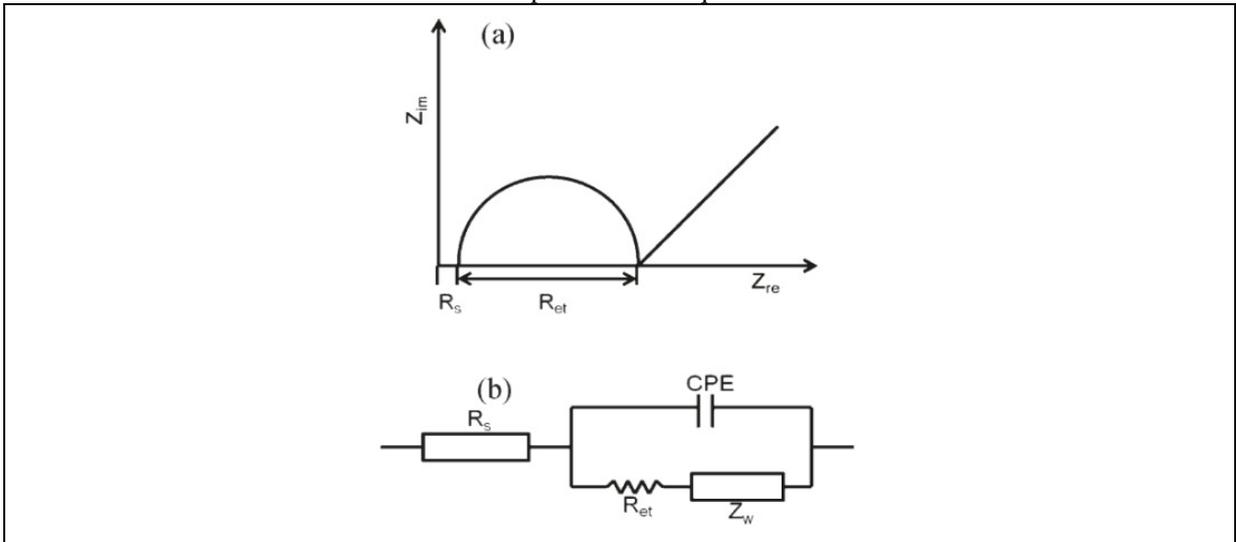
Normalmente, o limite de detecção obtido com a voltametria de pulso diferencial é duas ou três ordens de magnitude menor comparando com os valores obtidos por voltametria cíclica. Na DPV os limites de detecção estão na ordem de 10^{-8} mol L⁻¹ (SKOOG *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2013).

3.7.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) combina a análise das propriedades resistivas e capacitivas na superfície de eletrodo, baseado na perturbação de um sistema em equilíbrio usando um pequeno sinal de excitação sinusoidal (GUO *et al.*, 2012).

Guo e colaboradores (2012) relatam que um diagrama de Nyquist (Z_{im} vs. Z_{re}) do espectro de impedância eletroquímica é uma forma eficiente de medir a resistência à transferência de elétrons. Assim, uma forma típica de um espectro de impedância faradaico com transporte de massa representado em um gráfico de Nyquist consta de uma região semicircular situada no eixo Z_{re} seguida por uma reta com uma inclinação de 45° (Figura 5a). Nas frequências mais baixas encontra-se a parte linear que representa o processo de transferência de elétrons limitado por difusão. Já em frequências mais altas, um semicírculo é formado e está relacionado à cinética dos processos de transferência eletrônica. Assim, uma velocidade muito lenta na transferência de elétrons resulta em um grande semicírculo, que, por sua vez, não é acompanhado por uma reta. Na maioria das vezes, os espectros consistem tanto no semicírculo como na parte linear. A resistência à transferência de carga (R_{tc}) da sonda redox é proporcional ao diâmetro do semicírculo. É possível modelar os espectros obtidos utilizando modelos de circuitos equivalentes que são úteis para interpretar as propriedades elétricas da superfície de um eletrodo (GUO *et al.*, 2012). Na Figura 5b é mostrado o circuito de Randles qual representa este tipo de espectro.

Figura 5 - Gráfico típico de Nyquist (Z_{im} vs Z_{re}). (a) Espectro de impedância faradaica e (b) Circuito equivalente de medida de impedância eletroquímica faradaica



Fonte: GUO *et al*, 2012.

De um modo geral, pode-se considerar que a técnica de EIE é uma técnica de caracterização elétrica que fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução (LASIA, 1995, 2001), e estas informações são de grande interesse na eletroquímica aplicada ou básica.

Atualmente, a EIE é utilizada em uma ampla gama de estudos, como por exemplo, no estudo do transporte eletrônico em dispositivos semicondutores (CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006) e no estudo de processos cinéticos eletroquímicos, dentre os quais podemos citar os que ocorrem nos processos eletrocatalíticos (ALVES; SILVA; BOODTS, 1998). Neste trabalho a EIE foi empregada para avaliar as mudanças na resistência à transferência de elétrons que ocorreram na interface eletrodo/solução quando a superfície do GCE foi modificada com um filme de polimetionina (poly(Met)/GCE), ou modificada com um filme de polimetionina na presença do metal de transição cobalto (poly(Met)Co/GCE).

3.8 Eletrodos quimicamente modificados

Atualmente, o surgimento de fármacos mais potentes, usados em pequenas dosagens, tem aumentado a demanda por métodos analíticos cada vez mais sensíveis, rápidos, e econômicos. Diante disto, inúmeros pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos que atendam a essas exigências (PEREIRA, 2010).

Os eletrodos quimicamente modificados (EQM) têm sido amplamente utilizados no intuito de aumentar a sensibilidade e/ou seletividade de uma análise. Um eletrodo utilizado

como suporte para a construção de um eletrodo modificado, como por exemplo, um eletrodo de carbono vítreo, funciona como um conector para o fluxo de elétrons em um circuito eletrônico apropriado de forma a proporcionar condições para que possa ocorrer uma transformação redox com filme imobilizado (MURRAY, 1984, 1987; WANG, 1991). Uma vez realizada a imobilização na superfície eletródica, esta, passa a apresentar inúmeras possibilidades de interação com o composto de interesse. Em alguns casos, essas interações combinam-se de tal forma, que o eletrodo quimicamente modificado ganha seletividade, sensibilidade e aplicabilidade superiores às do eletrodo convencional sem prévia modificação. Uma maneira simples e conveniente de realizar uma modificação na superfície de um eletrodo é utilização de uma camada de filme polimérico. Muitos tipos de polímeros são empregados para revestir superfícies eletródicas, seja pela combinação de suas propriedades de adsorção, atração eletrostática e baixa solubilidade na solução eletrolítica, ou pela utilização de polímeros pré-formados ou obtidos através de polimerização eletroquímica (PEREIRA, 2010).

Uma área de grande importância atualmente na área da eletroanálise é o estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com poliaminoácidos e suas interações com compostos de interesse biológico e farmacêutico. Os poliaminoácidos são polieletrólitos sintéticos constituídos por cadeias de tamanho controlável contendo grupos funcionais específicos e sítios carregados com a capacidade de agir como nucleófilos ou centros reativos com compostos inorgânicos e orgânicos. O uso desses compostos como substâncias imobilizadas na superfície de eletrodos têm contribuído para aumentar a seletividade e sensibilidade dos métodos de detecção, através de etapas de pré-concentração que ocorrem por meio de interações específicas de grupos de polieletrólito e a espécie eletroativa (BERGAMINI, 2007).

Os polímeros derivados de alguns poliaminoácidos têm sido usados com sucesso no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, através de métodos simples e rápidos de preparação e obtenção de eletrodos modificados. A deposição do filme pode ser realizada de diferentes formas, onde alguns métodos têm sido mais empregados. O procedimento mais simples é baseado na adição do polímero sobre a superfície eletródica, seguida por uma lenta evaporação do solvente. Uma alternativa bastante efetiva é a preparação envolvendo eletropolimerização, baseada principalmente nas reações de oxirredução de precursores monoméricos eletroativos (BERGAMINI, 2007; MURRAY, 1984). Adicionalmente, a estabilidade da camada polimérica pode ser melhorada através da utilização de reações intercruzadas por meio da adição de contra-íons ou irradiação (PEREIRA, 2010).

Baseando-se nas propriedades dos poliaminoácidos, tais como propriedades de troca iônica ou de promover uma ação eletrocatalítica, além da relativa praticidade em modificar uma superfície eletródica utilizando estes compostos, acredita-se que esse sistema tenha grande potencial para uso na determinação de hormônios. Desta forma, neste trabalho, foram investigadas as propriedades de um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de polimetionina na presença do metal de transição cobalto (poly(Met)Co/GCE) na determinação do hormônio estriol em amostras de formulações farmacêuticas e urina.

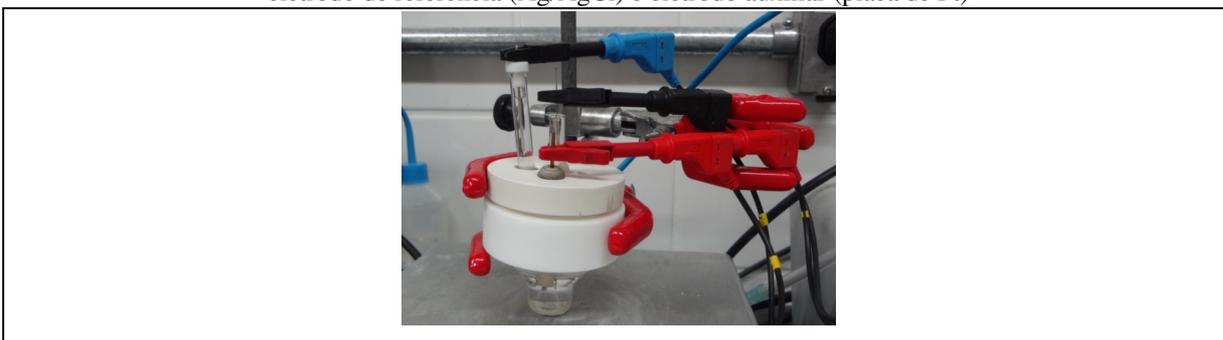
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos utilizados

4.1.1 Célula eletroquímica e eletrodos

A célula eletroquímica utilizada para a realização das medidas voltamétricas foi uma célula de vidro com capacidade de 20,0 mL possuindo entrada para três eletrodos, com entrada para borbulhamento e saída de gás, como mostra a Figura 6. O eletrodo de trabalho empregado foi um eletrodo de carbono vítreo (GC) de área geométrica igual a 0,070 cm². O eletrodo de referência foi o Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L⁻¹. O eletrodo auxiliar utilizado foi uma placa de platina de 1,0 cm².

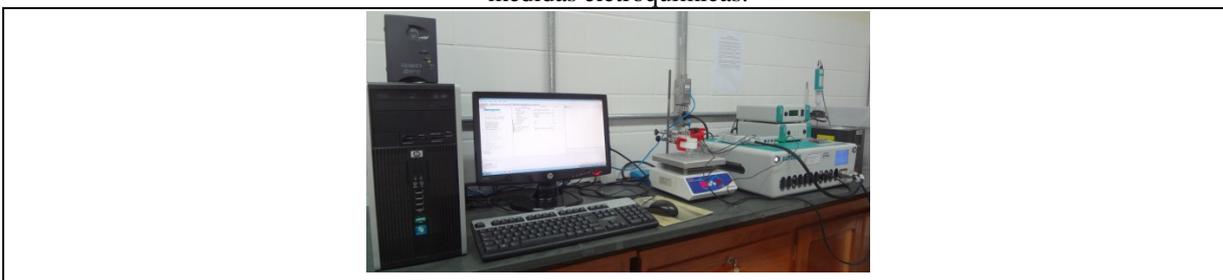
Figura 6 - Célula eletroquímica utilizada nas medidas eletroquímicas contendo: eletrodo de trabalho (GC), eletrodo de referência (Ag/AgCl) e eletrodo auxiliar (placa de Pt)



4.1.2 Potenciostato

Todas as medidas eletroquímicas realizadas neste trabalho foram executadas com o auxílio de um potenciostato/galvanostato modelo PGSTAT 128 N (Autolab, Holanda) acoplado a um computador HP (Figura 7) e controlado pelo *software* NOVA 1.10.4.

Figura 7 - Potenciostato/galvanostato PGSTAT 128 N acoplado a um microcomputador utilizado para as medidas eletroquímicas.



4.1.3 Espectrofotômetro

Para as medidas espectrofotométricas foi empregado um espectrofotômetro de feixe duplo da Allcrom (Modelo UV 6000). As leituras das absorvâncias do estriol foram realizadas no comprimento de onda de 281 nm em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

4.2 Reagentes e soluções

4.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica. Na tabela 3 encontram-se listados os reagentes utilizados nas análises, bem como suas fórmulas químicas, procedência e graus de pureza.

Tabela 3: Lista de reagentes com a procedência e a pureza.

Reagente	Fórmula química	Procedência	Pureza (%)
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	PROQUÍMIOS	99,8
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	ALPHATEC	99,5
Ácido clorídrico	HCl	ALPHATEC	37,0
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	ISO FAR	85,0
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	VETEC	99,0
Álcool etílico	CH ₃ CH ₂ OH	Sigma-Aldrich	99,8
Álcool metílico	CH ₄ O	Sigma-Aldrich	99,8
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	Próquímios	99,0
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	ALPHATEC	99,0
Ferricianeto de potássio	K ₄ [Fe(CN) ₆]	NEON	99,9
Hidróxido de sódio	NaOH	Próquímios	99,0
Estriol	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	Sigma-Aldrich	≥97%
Cloreto de cobalto II	CoCl ₂ .6H ₂ O	Êxodo Científica	98-102%
Cloreto de potássio	KCl	ALPHATEC	99-105

4.2.2 Soluções

4.2.2.1 Solução tampão fosfato e Britton-Robinson (BR)

A solução tampão Britton-Robinson na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada através da mistura ácido bórico, ácido fosfórico e ácido acético, todos na concentração de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Para o ajuste do pH adicionou-se solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ até o valor de pH requerido. Foi utilizado um pHmetro modelo TEC-5 da Tecnal, devidamente calibrado com soluções tampão de referência de pH 4,0 e 7,0 à temperatura ambiente, para a realização das medidas de pH.

O preparo da solução tampão fosfato (PBS) na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi realizado misturando quantidades equimolares de KH_2PO_4 ($0,1 \text{ mol}$) e K_2HPO_4 ($0,1 \text{ mol}$) dissolvidos em $1,0 \text{ L}$ de água ultrapura. Para o ajuste do pH foi adicionado solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ até o valor de pH requerido.

4.2.2.2 Solução estoque de estriol para determinação eletroquímica

Para a preparação da solução estoque de estriol na concentração de $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi pesado $0,020 \text{ g}$ de estriol, que foi dissolvido $5,0 \text{ mL}$ de álcool metílico. Essa solução foi armazenada ao abrigo de luz e sob-refrigeração em uma temperatura de cerca de $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas, uma solução de estriol $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da diluição desta solução.

4.2.2.3 Solução estoque da estriol para determinação espectrofotométrica

A solução estoque de E3 foi preparada dissolvendo $25,0 \text{ mg}$ de estriol em álcool etílico. Após esse procedimento, a solução foi diluída para $50,0 \text{ mL}$ em balão volumétrico, com o mesmo solvente. Após, foram retirados $10,0 \text{ mL}$ desta solução e, na sequência, foi realizada uma nova diluição para $100,0 \text{ mL}$ em balão volumétrico, utilizando o mesmo solvente.

O preparo desta solução foi realizado conforme preconizado pela Farmacopeia Americana 29ª edição (USP 29). A solução foi mantida ao abrigo de luz e sob refrigeração à temperatura de cerca de $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.2.4 Preparo das amostras

4.2.2.4.1 Preparo da amostra de urina humana para determinação de estriol

A amostra da urina foi coletada de voluntários e mantida sob refrigeração em uma temperatura de cerca de 4,0 °C. Para comprovar a aplicabilidade da metodologia, na faixa linear de concentração da curva analítica, foi realizada a determinação de estriol em amostras de urina na concentração de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a coleta da urina, foi preparada uma amostra de urina fortificada, onde 75 μL de uma solução padrão estoque de estriol na concentração de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados a um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com urina, obtendo-se uma concentração final de estriol igual a $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Uma alíquota de 275 μL da solução de estriol, na presença de urina, foi adicionada à célula eletroquímica contendo 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH = 7,0) e, em seguida, foi realizada a medida eletroquímica. As adições subsequentes de incremento de volume de solução padrão de estriol foram realizadas seguindo o método de adição de padrão.

4.2.2.4.2 Preparo da amostra de comprimidos contendo estriol para determinação eletroquímica

Foram utilizados comprimidos de estriol da marca (Ovestrion®) que, segundo o fabricante, continham 2 mg de estriol cada. Cinco comprimidos desse medicamento foram macerados num almofariz com um pistilo. O pó foi utilizado para a preparação de 10 mL de solução da amostra em metanol. A solução foi homogeneizada utilizando banho ultrassônico por 30 minutos. Em seguida, centrifugada por cinco minutos para que os excipientes não dissolvidos fossem decantados. Uma alíquota de 144 μL foi adicionada a um balão de 5 mL e o volume foi completado com metanol. Essa solução foi, por sua vez, utilizada para os ensaios de quantificação do estriol.

4.2.2.4.3 Preparo da amostra de comprimidos e determinação espectrofotométrica de estriol

O teor de estriol presente em comprimidos também foi determinado através do método espectrofotométrico, conforme descrito na USP 29. Para esse fim, 25 comprimidos de Ovestrion®/2mg foram pesados, pulverizados e posteriormente, uma quantidade do pó obtido equivalente a 50 mg de estriol foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o

volume foi completado com etanol. Após 30 minutos de agitação em banho ultrassônico, a solução foi centrifugada por cinco minutos para que os excipientes não dissolvidos fossem decantados. Uma alíquota de 10,0 mL foi adicionada a um balão de 100,0 mL e o volume foi completado com etanol. As absorvâncias das soluções foram medidas em 281 nm utilizando o etanol como branco. O teor de estriol presente nas amostras farmacêuticas foi determinado pela relação das absorvâncias da amostra e do padrão. As determinações de estriol foram realizadas em triplicata, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados. Posteriormente, realizou-se uma comparação estatística com o conteúdo de estriol determinado pelo método proposto, utilizando o teste t de Student e o teste F (95% de confiança).

4.3 Metodologia

4.3.1 Determinação das quantidades de estriol presente em urina utilizando método eletroquímico

A determinação de estriol nas amostras de urina foi realizada através do método da adição de padrão. Após o registro do branco (tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH= 7) aplicando um potencial no sentido da oxidação no intervalo de potencial de +0,25 a +0,80 V, utilizando a técnica de VPD, foram adicionados à célula eletroquímica, contendo 10 mL do eletrólito suporte, um volume de 275 µL da solução da amostra de urina preparada conforme descrito na sessão 4.2.2.5.1, e então os voltamogramas de pulso diferencial para a amostra foram registrados. Na sequência, foram realizadas adições sucessivas do padrão de estriol e registrados os voltamogramas após cada adição.

4.3.2 Determinação da quantidade de estriol presente em comprimidos utilizando método eletroquímico

A determinação de estriol nas formulações farmacêuticas foi realizada através do método da adição de padrão. Após o registro do branco (tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH= 7) aplicando um potencial no sentido da oxidação no intervalo de potencial de 0,25 a 0,80 V, utilizando a técnica de VPD, foram adicionados à célula eletroquímica, contendo 10 mL do eletrólito suporte, um volume de 200 µL da solução da amostra de comprimidos preparada conforme descrito na sessão 4.2.2.5.2, e então os voltamogramas de pulso diferencial para a

amostra foram registrados. Na sequência, foram realizadas adições sucessivas do padrão de estriol e registrados os voltamogramas após cada adição.

4.3.3 Preparação do eletrodo de carbono vítreo modificado com polimetionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE)

Inicialmente foi realizada uma etapa de limpeza da superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE). A limpeza consistiu em polimento do eletrodo em suspensão de alumina 0,5 μm , seguido de banho de ultrassom em etanol por cinco minutos para retirar as partículas de alumina adsorvidas e depois em água ultrapura por cinco minutos. O procedimento de eletropolimerização foi realizado de acordo com relatos de estudos anteriores, (GU *et al.*, 2015; MASOUD; EI-HAMID, 1989; OJANI; ALINEZHAD; ABEDI, 2013), contudo, com algumas modificações.

Assim, foram empregados 10 ciclos consecutivos de eletropolimerização utilizando a voltametria cíclica, no intervalo de potencial de $-0,6$ a $+2,0$ V numa velocidade de 100 mV s^{-1} , em solução de concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de metionina e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Co.Cl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ preparada em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0.

4.3.3.1 Determinação da área eletroativa do eletrodo de carbono vítreo modificado com metionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE)

Para determinar a área eletroativa do poly(Met)Co/GCE, foram realizados experimentos de voltametria cíclica no intervalo de potencial de $-0,1$ a $+0,6$ V em diferentes velocidades de varredura ($2,5 - 500 \text{ mV s}^{-1}$), em uma solução de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.3.2 Estudos de Impedância Eletroquímica

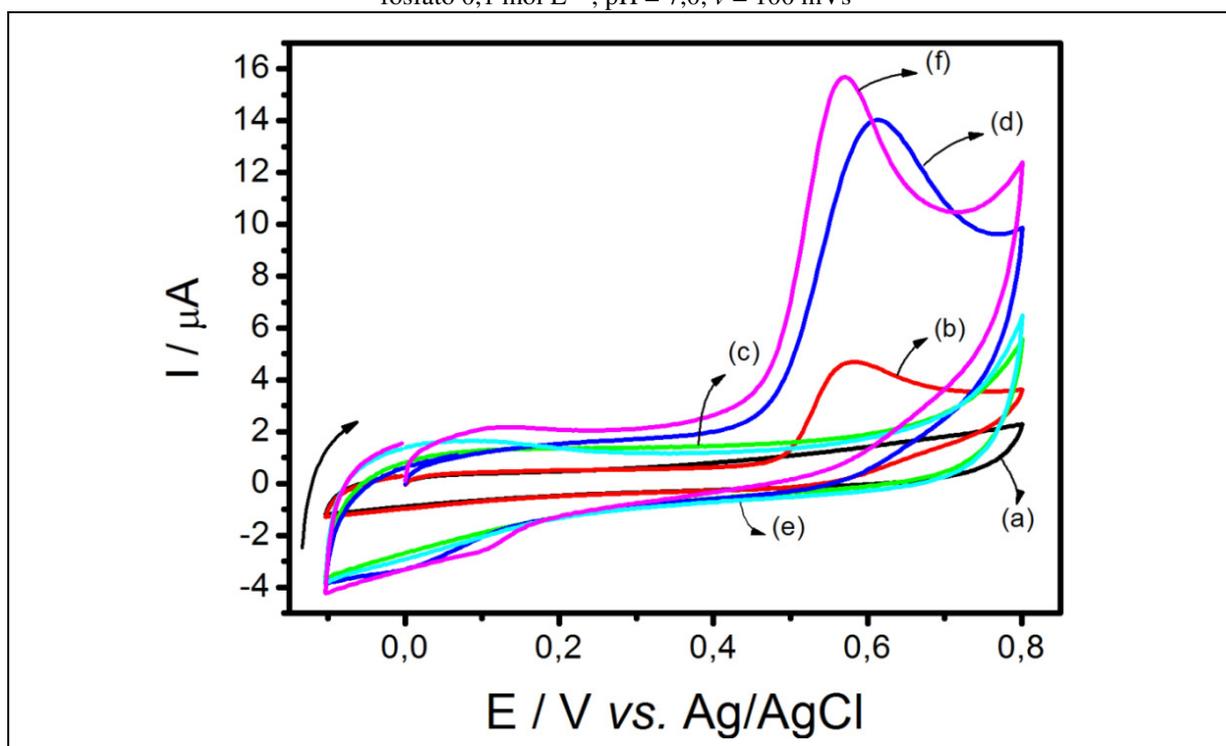
As medidas de impedância eletroquímica para o GCE e para os eletrodos modificados de poly(Met)/GCE e de poly(Met)Co/GCE foram realizadas em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl como eletrólito de suporte contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. O intervalo de frequência usado foi de $10^5 - 0,1$ Hertz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha da modificação a ser utilizada no eletrodo de trabalho

Inicialmente, foram realizados testes utilizando o eletrodo de carbono vítreo (GCE) sem modificação, o GCE modificado utilizando metionina (poly(Met)/GCE) e o GCE modificado com metionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE) com a finalidade de comparar a oxidação eletroquímica do estriol em diferentes superfícies eletródicas. Para este estudo, foi utilizada a técnica de voltametria cíclica, no intervalo de potencial de -0,1 a +0,8 V numa velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} . A concentração de estriol utilizada foi de $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos registrados usando o GCE na ausência (a) e na presença (b) de estriol; com o uso de poly(Met)/GCE na ausência (c) e na presença (d) de estriol e voltamogramas cíclicos obtidos usando o poly(Met)Co/GCE na ausência (e) e na presença (f) de Estriol. [Estriol] = $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$



Nestas condições experimentais, o estriol foi eletroquimicamente ativo e apresentou um processo de oxidação irreversível sobre a superfície dos três eletrodos testados. Foi observado que a oxidação eletroquímica do estriol sobre a superfície do GCE ocorreu em um potencial de pico (E_p) igual a +0,58 V e produziu uma corrente de pico anódica (I_{pa}) igual a $4,70 \mu\text{A}$, como pode ser observado no voltamograma b, da Figura 8. Porém, com o uso do

poly(Met)/GCE foi observado que o processo de oxidação do estriol ocorreu no $E_p = +0,61$ V e a corrente de pico obtida foi de $14,0 \mu\text{A}$, como mostra o voltamograma d, da Figura 8. Ainda, com o uso do poly(Met)Co/GCE foi observado que o processo de oxidação do estriol ocorreu no $E_p = +0,57$ V e a corrente de pico obtida foi de $15,7 \mu\text{A}$, como mostra o voltamograma f, da Figura 8.

Como pode ser observado na comparação dos voltamogramas da Figura 8, a corrente de pico obtida com o uso do poly(Met)Co/GCE foi três vezes maior do que a observada para o eletrodo de GC sem modificação. Comparando os eletrodos modificados de poly(Met)/GCE e de poly(Met)Co/GCE não existe diferença significativa no valor da corrente de pico obtida utilizando cada um destes eletrodos. No entanto, verifica-se que a oxidação do estriol sobre a superfície do poly(Met)/GCE ocorreu em um valor de potencial de pico maior (+0,61 V) quando comparado com o potencial de pico (+0,57 V) obtido utilizando o poly(Met)Co/GCE. Assim, o poly(Met)Co/GCE foi selecionado para desenvolver uma metodologia para a determinação eletroquímica de estriol.

5.2 Eletropolimerização da metionina e do cobalto sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo

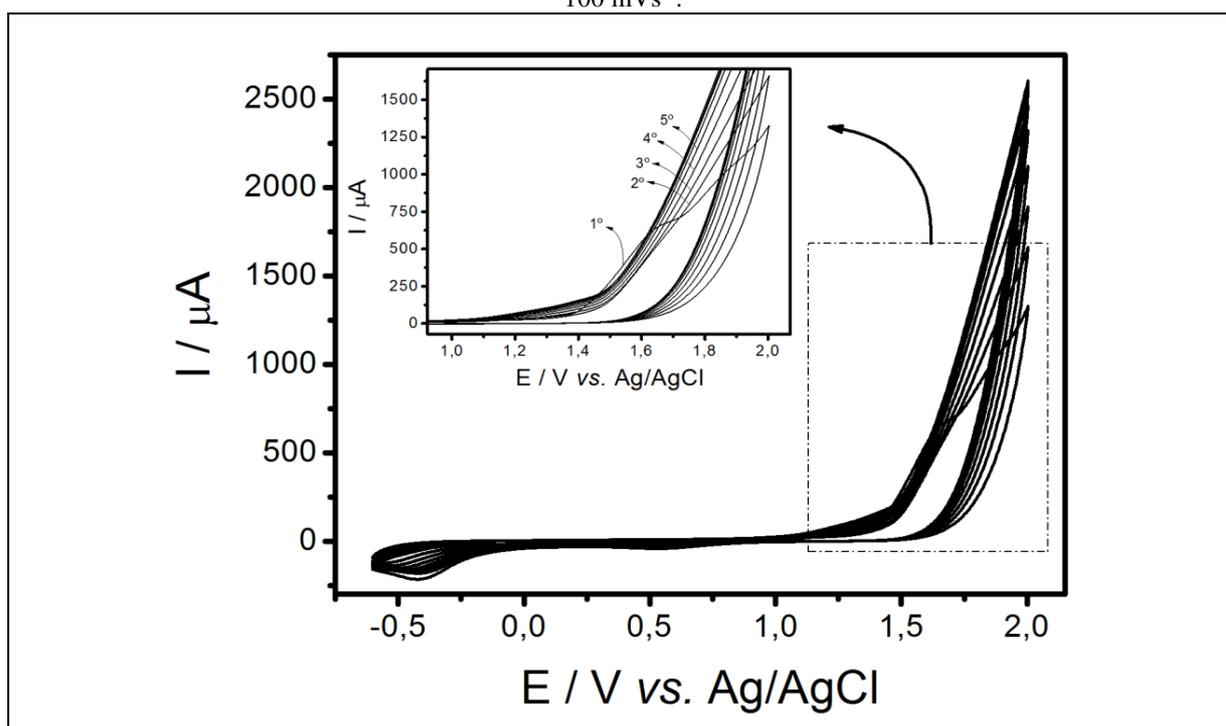
Muitos estudos têm sido realizados utilizando complexos de íons de metais de transição para modificação do eletrodo. Neste contexto, a atividade catalítica pode ser melhorada principalmente devido às interações eletrônicas entre o metal de transição e grupos funcionais no ligante quelante (BOOPATHI; WON; SHIM, 2004; FU et al., 2016; GU et al., 2015; ZUO; ZHANG; LI, 2012). Existem estudos que mostram que o uso destes complexos pode levar a um incremento na sensibilidade do método, uma vez que nestes casos, os metais de transição atuam como uma via efetiva de condução de elétrons entre eletrodo e eletrólito, favorecendo as reações de oxirredução (GU et al., 2015; MEENAKSHI et al., 2016).

Entretanto, existem alguns inconvenientes associados ao uso de complexos de metal de transição, como por exemplo, a maioria deles tem uma vida útil limitada por decomposição ou dissociação do ligante em uma solução (CHEUNG et al., 2007). Assim, muito desses complexos precisam ser imobilizados em uma matriz rígida [por ex. um polímero], de modo a melhorar a sua estabilidade. Existem trabalhos na literatura que relatam o uso de polímeros de aminoácidos com metais de transição na modificação de eletrodos com resultados satisfatórios (GU et al., 2015; OJANI et al., 2014). Assim, neste trabalho foi utilizado o aminoácido metionina e o cobalto (Co^{2+}) foi escolhido como metal de transição,

uma vez que seus complexos possuem estrutura simples e estável (MASOUD; EI-HAMID, 1989).

Como já abordado no item 4.3.3, a eletropolimerização foi realizada de acordo com procedimentos reportados na literatura (GU *et al.*, 2015; MASOUD; EI-HAMID, 1989; OJANI; ALINEZHAD; ABEDI, 2013), mas com algumas modificações. Assim, neste trabalho, a eletropolimerização foi conduzida empregando-se 10 ciclos consecutivos de varredura de potencial, utilizando a técnica de voltametria cíclica no intervalo de potencial de -0,6 a +2,0 V numa velocidade de 100 mVs^{-1} , em uma solução contendo $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de metionina e $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ preparada em tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 4,0. A Figura 9 mostra o voltamograma cíclico obtido durante o processo de eletropolimerização.

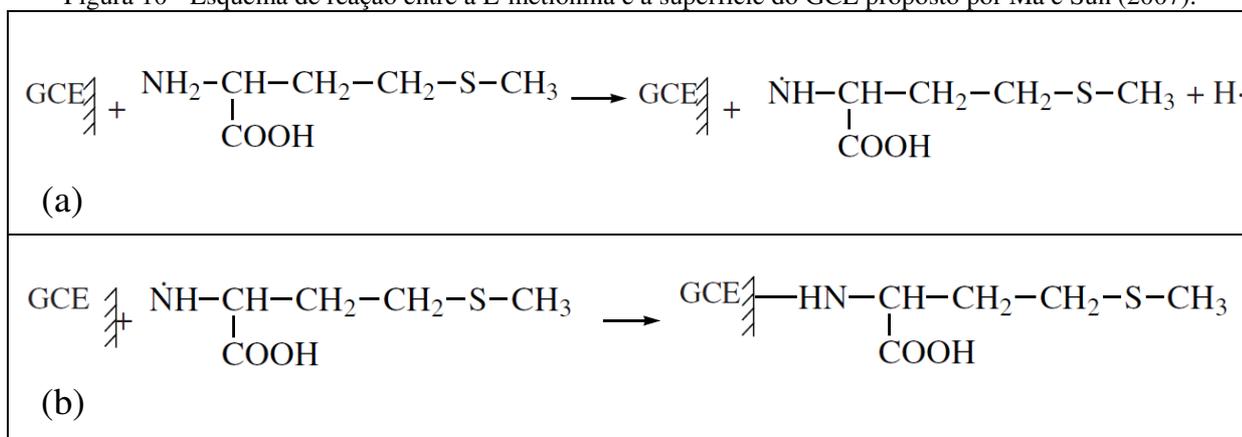
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos da eletropolimerização (10 ciclos) do eletrodo de carbono vítreo em solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de metionina e $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$.



Como pode ser visto na Figura 9, no primeiro ciclo a L-metionina mostrou uma oxidação eletroquímica irreversível, apresentando um pico anódico no potencial de +1,63 V. Nenhum pico catódico foi observado na varredura reversa. Comportamento semelhante foi observado em trabalhos anteriores, onde a L-metionina foi utilizada para modificar eletrodos sólidos (CHEEMALAPATI; DEVADAS; CHEN, 2014; MA; SUN, 2007; OJANI; ALINEZHAD; ABEDI, 2013). Após completar mais ciclos, o pico de oxidação desapareceu completamente e houve a formação de um filme polimérico sobre a superfície do GCE.

Ojani, Alinezhad e Abedi (2013) afirmam que o desaparecimento do pico anódico observado no primeiro ciclo deve-se ao espessamento do polímero durante o processo de eletropolimerização. Pressupõe-se que, durante a eletropolimerização de alguns tipos de aminoácidos (no caso deste estudo, a L-metionina) utilizando um eletrodo de carbono vítreo, as espécies obtidas durante a primeira transferência de elétrons sofrem uma reação química. A Figura 10 mostra o mecanismo de reação proposto por Ma e Sun (2007) para a reação entre a L-metionina e a superfície do GCE:

Figura 10 - Esquema de reação entre a L-metionina e a superfície do GCE proposto por Ma e Sun (2007).



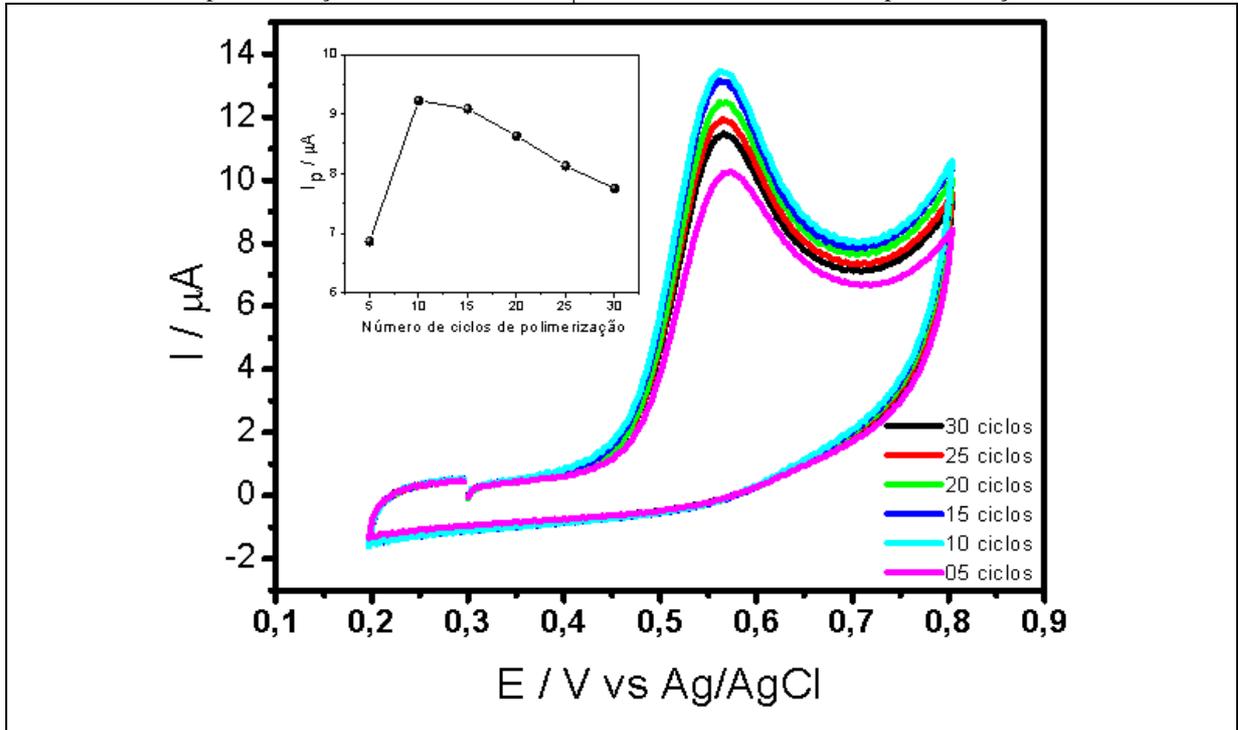
Como observado na Figura 10-a, os grupos amino da L-metionina perderam um elétron oxidando a espécie para radical livre na superfície do eletrodo. Na sequência, os radicais reagem com a superfície de GCE rapidamente, tornando a metionina modificada estável na superfície do eletrodo (Figura 10-b).

O efeito do número de ciclos de eletropolimerização sobre a resposta do eletrodo de carbono vítreo modificado por poly(Met)Co também foi estudado. Foram realizados experimentos de voltametria cíclica utilizando uma concentração de estriol de $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em uma solução de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7$), no intervalo de potencial de $+0,2$ a $+0,8\text{V}$ utilizando o poly(Met)Co/GCE modificado utilizando 5, 10, 15, 20, 25 e 30 ciclos. A Figura 11 mostra os resultados obtidos neste estudo.

Ao se aumentar o número de ciclos de eletropolimerização até 10 ocorreu um aumento na resposta de corrente do eletrodo, contudo, o emprego de mais de 10 ciclos apresentou um efeito negativo, obtendo-se uma menor sensibilidade para o eletrodo modificado. Acredita-se que acima de 10 ciclos, o filme produzido alcança uma espessura tal que dificulta a transferência de elétrons entre eletrodo e eletrólito, levando a uma redução da

corrente obtida. Em virtude destes resultados, foi selecionado 10 ciclos de eletropolimerização para a modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo nos estudos subsequentes.

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos registrados para uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$, usando o poly(Met)Co/GCE preparado com diferentes números de ciclos de polimerização. Inserido: Gráfico I_p versus número de ciclos de polimerização

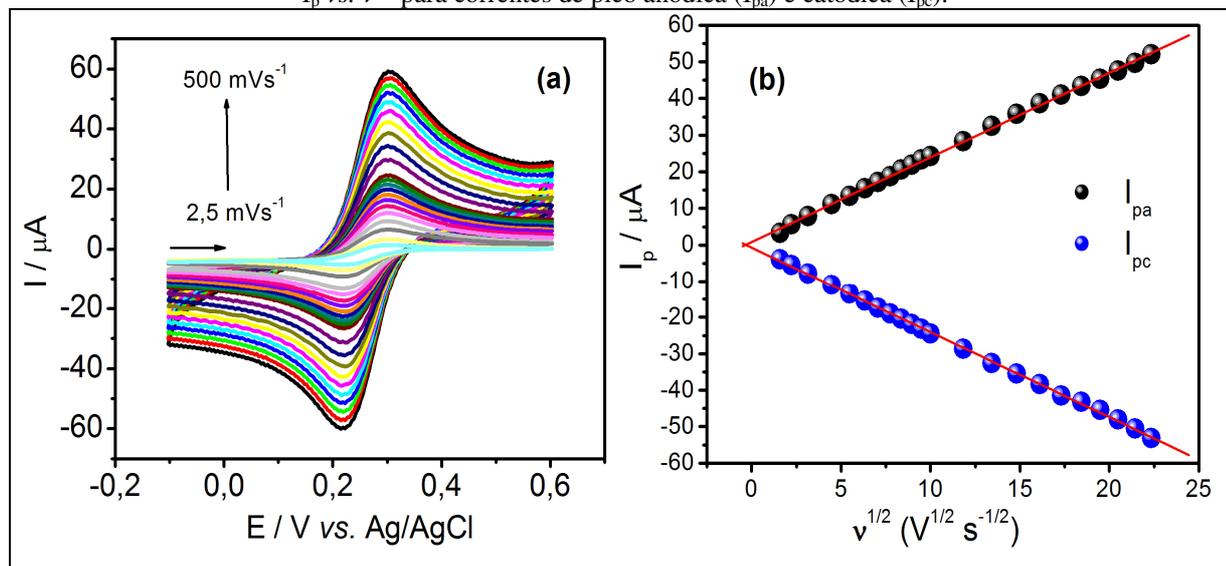


5.3 Determinação da área eletroativa do eletrodo de carbono vítreo modificado com metionina e cobalto (poly(Met)Co/GCE)

Como descrito no ítem 4.3.3.1, com a finalidade de determinar a área eletroativa do poly(Met)Co/GCE, foram realizados experimentos de voltametria cíclica no intervalo de potencial de -0,1 a +0,6 V em diferentes velocidades de varredura ($2,5 - 500 \text{ mV s}^{-1}$), em uma solução de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 12 (a, b) apresenta os voltamogramas cíclicos registrados, bem como os gráficos de corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Constatou-se que aumentando a velocidade de varredura, as correntes de pico anódica e catódica variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que indica que o processo foi totalmente controlado por difusão (BARD e FAULKNER, 2001).

Figura 12 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (2,5 – 500 mV s⁻¹) para o poly(Met)/Co/GCE em solução de K₃Fe(CN)₆ 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Gráfico com o registro de I_p vs. v^{1/2} para correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}).



A relação linear ente as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura (v^{1/2}) estão apresentadas nas equações 3 e 4, respectivamente.

$$I_{pa}(A) = 8,58 \times 10^{-7} + 2,31 \times 10^{-6} v^{1/2}(V s^{-1})^{1/2} \quad (3)$$

$$I_{pc}(A) = -6,99 \times 10^{-6} - 2,33 \times 10^{-6} v^{1/2}(V s^{-1})^{1/2} \quad (4)$$

De acordo com a equação de Randles-Sevcik (equação 5), existe uma relação linear entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura para sistemas reversíveis com transferência de massa controlada por difusão (BARD, A.J., FAULKNER, 2001).

$$I_p = \pm(2,69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}C_0 v^{1/2} \quad (5)$$

Sendo, I_p a corrente de pico anódica ou catódica (Ampère); n o número de elétrons envolvidos no processo redox; A a área eletroativa do eletrodo (cm²), D o coeficiente de difusão (cm² s⁻¹), C₀ a concentração da espécie eletroativa (mol cm⁻³) e v^{1/2} a raiz quadrada da velocidade de varredura (V s⁻¹).

Rearranjando a equação de Randles-Sevcik e isolando a área (A) na equação 5, é possível obter informações a respeito da área efetiva do eletrodo.

$$A = \frac{I_p}{v^{1/2}} \times \frac{1}{2,686 \times 10^5 \times n^{3/2} \times D^{1/2} \times C_0} \quad (6)$$

Observe que o primeiro termo da equação se refere ao coeficiente angular das retas obtidas na Figura 12.b [Ampères/(V s⁻¹)^{1/2}]. Para o cálculo da área eletroativa, considerou-se que $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $n = 1$ e $C_0 = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$ (BARD, A.J., FAULKNER, 2001). Com base nestes dados, calculou-se a área eletroativa do poly(Met)/Co/GCE foi igual a $0,0031 \text{ cm}^2$.

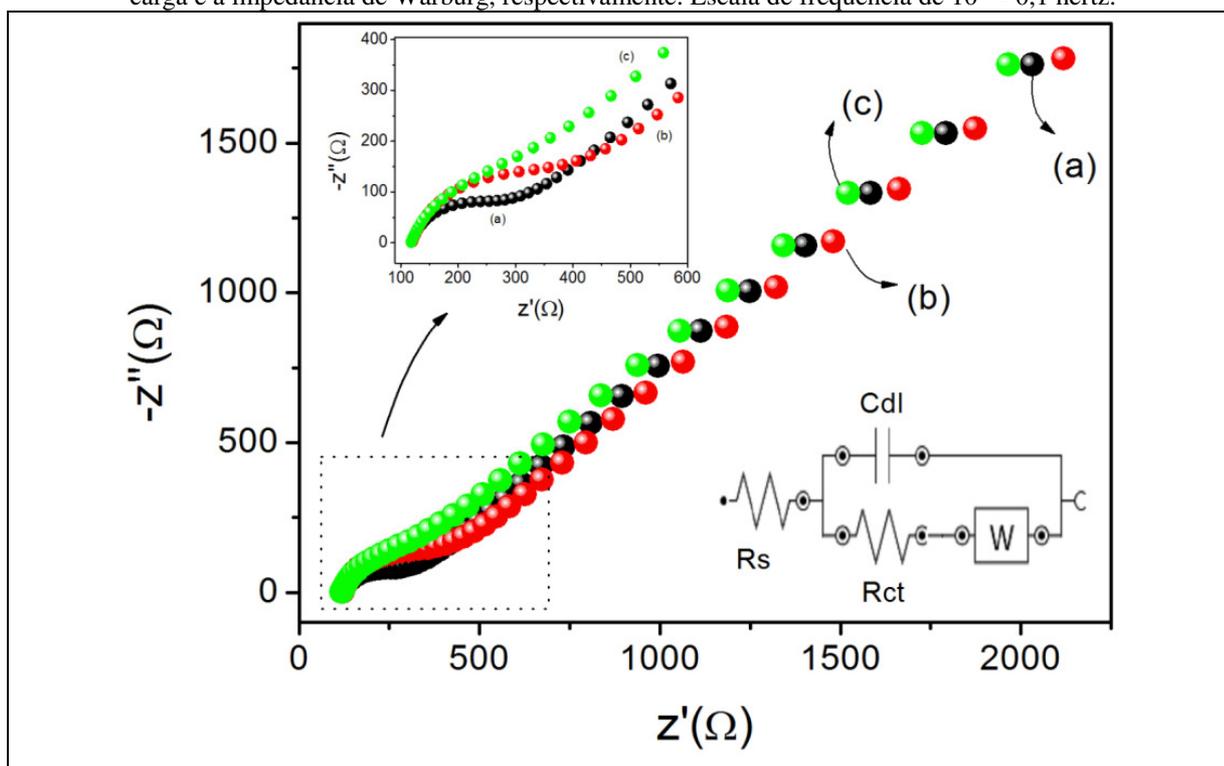
5.4 Estudos de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é um método eficaz para monitorar as alterações de propriedades interfaciais da superfície de eletrodos modificados, uma vez que o diâmetro do semicírculo observado no diagrama de Nyquist é igual à resistência à transferência de elétrons (R_{ct}), a qual, por sua vez, controla a cinética de transferência de elétrons na superfície do eletrodo (BARD, A.J., FAULKNER, 2001; K'OWINO; SADIK, 2005). Como abordado no ítem 4.3.3.2, as propriedades de impedância eletroquímica do GCE e dos eletrodos modificados poly(Met)/GCE e poly(Met)Co/GCE foram registradas em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl como eletrólito suporte contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 13.

Conforme ilustrado na Figura 13, o GCE e o poly(Met)/GCE mostram porções semicirculares em frequências mais elevadas e partes lineares em frequências mais baixas. O poly(Met)/GCE produziu um gráfico com um grande semicírculo, indicando uma transferência lenta de elétrons. O valor calculado da R_{ct} para o GCE foi 134Ω . Para o poly(Met)/GCE, o valor de R_{ct} aumentou para 183Ω . Atribui-se esse aumento na resistência à baixa condutividade elétrica do filme de poly(Met), o que dificultou a transferência eletrônica na superfície do eletrodo. O poly(Met)Co/GCE produziu um gráfico de Nyquist quase linear sem o semicírculo. O valor de R_{ct} calculado foi de 123Ω , evidenciando que houve uma diminuição da resistência quando comparada com o valor obtido com o GCE. Esse resultado indica uma transferência de elétrons rápida do poly(Met)Co/GCE para as espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução. Acredita-se que devido à boa condutibilidade do metal de transição Co, a transferência eletrônica entre o par redox e a superfície do eletrodo tornou-se mais fácil. Dessa forma, a velocidade de transferência de elétrons entre as espécies redox

em solução e a superfície do eletrodo foi consideravelmente aumentada na presença do filme poly(Met)Co.

Figura 13 - Gráficos de EIE do CGE sem modificação (curva a), do poly(Met)/GCE (curva b) e do poly(Met)Co/GCE (curva c), obtidos em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl como eletrólito de suporte contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Inseto: Circuito equivalente do tipo Randles. R_s , C_{dl} , R_{ct} e W representam a resistência da solução eletrolítica, capacitância de dupla camada, a resistência de transferência de carga e a impedância de Warburg, respectivamente. Escala de frequência de $10^5 - 0,1$ hertz.



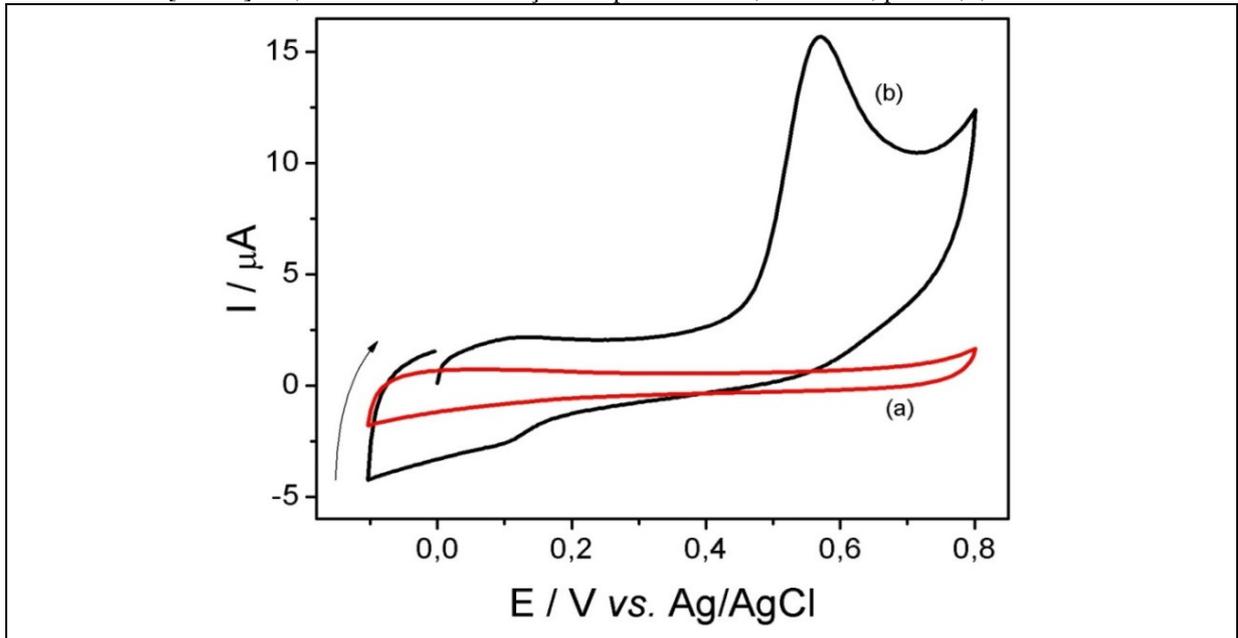
5.5 Comportamento eletroquímico do estriol sobre a superfície do poly(Met)Co/GCE

5.5.1 Perfil voltamétrico do estriol sobre a superfície do poly(Met)Co/GCE

O comportamento eletroquímico do estriol em relação à resposta do poly(Met)Co/GCE foi estudado por voltametria cíclica em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, no intervalo de potencial de $-0,1$ até $0,8 \text{ V}$. O perfil voltamétrico obtido para o estriol nas condições descritas é apresentado na Figura 14.

Observa-se que, na ausência de estriol (linha vermelha, (a)) não foi observado nenhum processo eletroquímico. Contudo, na presença de estriol (linha preta, (b)), é possível observar um pico de oxidação irreversível, bem definido, com E_p em $+0,57 \text{ V}$. De acordo com Santos *et al* (2010) esse processo corresponde à oxidação do grupo hidroxila fenólico na estrutura do estriol, como mostra a figura 17.

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando o poly(Met)Co/GCE na ausência (a) e na presença (b) de estriol. [estriol] = 0,14 mmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,0, v = 100 mV s⁻¹

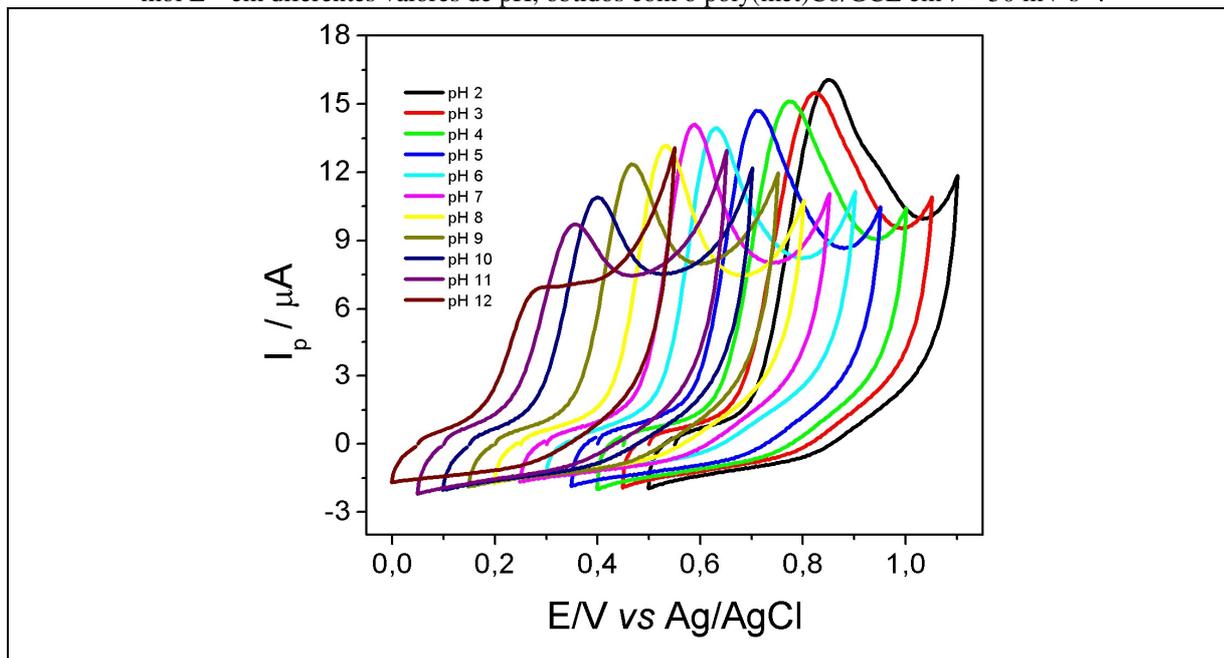


5.5.2 Influência do pH do eletrólito suporte na oxidação eletroquímica do estriol sobre o poly(Met)Co/GCE

A influência do pH do eletrólito suporte na oxidação eletroquímica do estriol sobre o poly(Met)Co/GCE foi avaliada utilizando a técnica de voltametria cíclica no intervalo de pH de 2,0 a 12,0, em tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ contendo 0,14 mmolL⁻¹ de estriol. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 15. A partir dos voltamogramas cíclicos mostrados na referida figura, foi possível obter o gráfico da relação da corrente de pico anódica (I_{pa}) e do potencial de pico anódico (E_{pa}) em função do aumento do pH (Figura 16).

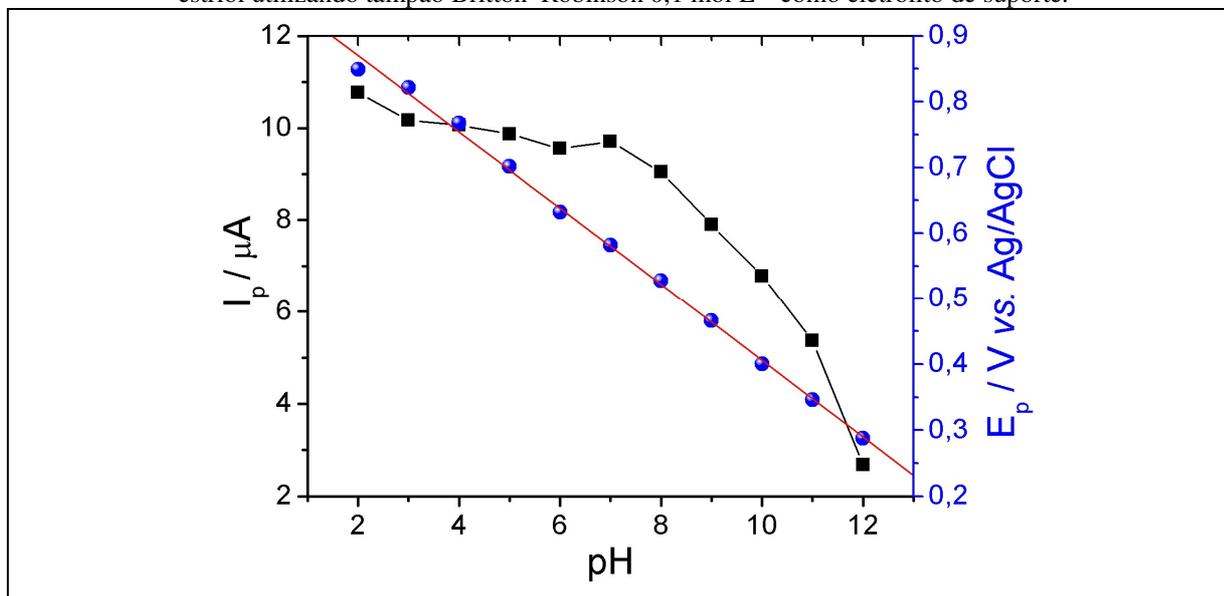
O gráfico da Figura 16 que mostra a variação do E_{pa} em relação ao aumento do pH (E_{pa} vs pH), fornece informações importantes sobre o processo de oxidação estriol. Verifica-se neste gráfico que o potencial de pico de oxidação do estriol deslocou para valores menos positivos à medida que ocorreu a redução da concentração de íons hidrogênio do eletrólito, ou seja, com o aumento do pH. Vega *et al.* (2007) em seu trabalho sobre a oxidação de compostos fenólicos estrogênicos também relatou esse mesmo comportamento, que é típico para a oxidação de fenóis. Trata-se de uma consequência da desprotonação durante o processo de oxidação, que é facilitada pelo maior valor de pH (CESARINO; CINCOTTO; MACHADO, 2015; SANTOS *et al.*, 2010).

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos de uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH, obtidos com o poly(met)Co/GCE em $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Pode-se observar também na Figura 16, no gráfico de E_{pa} vs pH, a existência de uma relação linear entre o E_{pa} e o pH, com inclinação de $0,058 \text{ V pH}^{-1}$ ($R^2 = 0,998$). Este valor está bem próximo da inclinação nernstiana de $0,059 \text{ V/unidade de pH}$ à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (ZARE; SOBHANI; MAZLOUM-ARDAKANI, 2007). Esse resultado sugere que na reação de oxidação do estriol o número de elétrons e de íons hidrônio envolvidos é igual, em concordância com o que é descrito na literatura para a oxidação eletroquímica do estriol (CESARINO; CINCOTTO; MACHADO, 2015; SANTOS *et al.*, 2010).

Figura 16 - Influência do pH sobre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e sobre o potencial de pico anódico (E_{pa}) do estriol utilizando tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte.



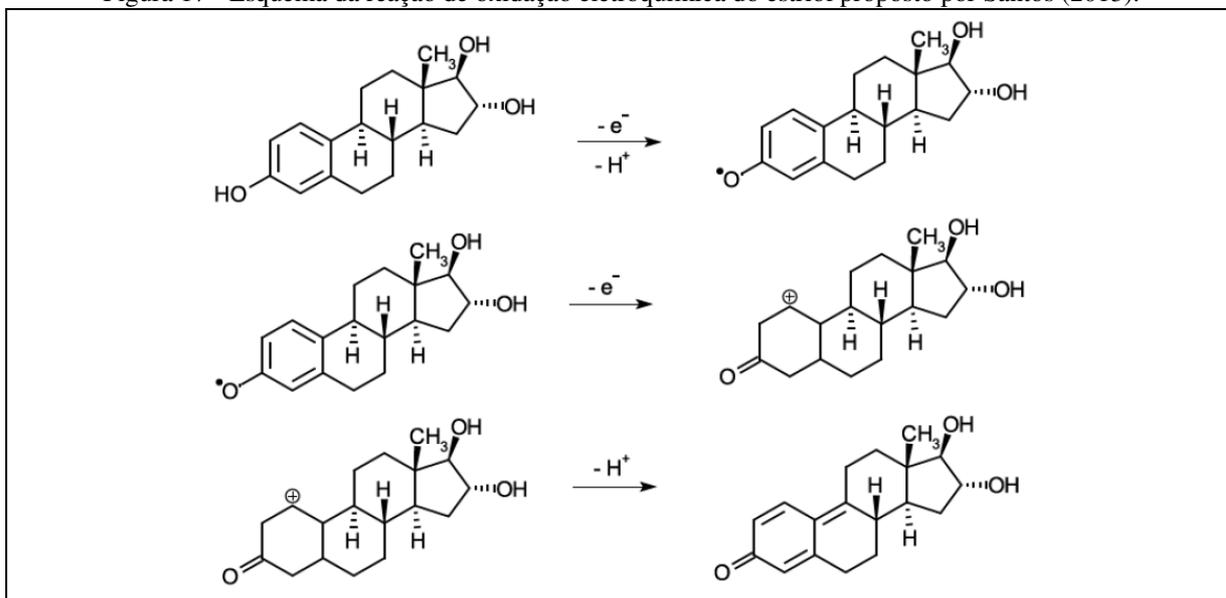
$$E_{pa} = (0,988 \pm 0,008) - (0,058 \pm 9,57 \times 10^{-4})\text{pH} \quad (7)$$

Como já mostrado e discutido anteriormente, a oxidação eletroquímica do estriol é um processo irreversível. De acordo com a teoria da voltametria cíclica, para uma reação irreversível, a diferença entre o potencial de pico na varredura inicial (E_p) e o potencial de pico a meia altura ($E_{p/2}$) é dada pela Equação 8:

$$|E_p - E_{p/2}| = 48 \text{ mV}/\alpha n \text{ (à } 25^\circ\text{C)} \quad (8)$$

Onde n é o número de elétrons e α é o coeficiente de transferência de elétrons (BARD, A.J., FAULKNER, 2001; SHOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP, 1990). Empregando o voltamograma cíclico obtido para o estriol em solução tampão PBS 0,1M pH 7 (Figura 8), foi obtida a diferença entre os valores de potencial de pico (E_p) e o potencial de pico a meia altura ($E_{p/2}$). O valor médio ($E_p - E_{p/2}$) calculado foi de 48,0 mV e aplicando-se a Equação 6 obteve-se o valor para $\alpha n = 1,00$. Considerando $\alpha = 0,5$, um valor usual para compostos orgânicos quando não se tem o valor experimental calculado, o valor de n obtido foi igual a 2. (BARD, A.J., FAULKNER, 2001). Deste modo, pode-se concluir que o processo de oxidação do estriol sobre o poly(Met)Co/GCE envolve dois elétrons por molécula do analito. Estes resultados estão de acordo com o comportamento eletroquímico apresentado pelo estriol em estudos anteriores (SANTOS *et al.*, 2010). A Figura 17 mostra um esquema da reação de oxidação eletroquímica do estriol proposto no trabalho de Santos *et al.*, 2010.

Figura 17 - Esquema da reação de oxidação eletroquímica do estriol proposto por Santos (2013).



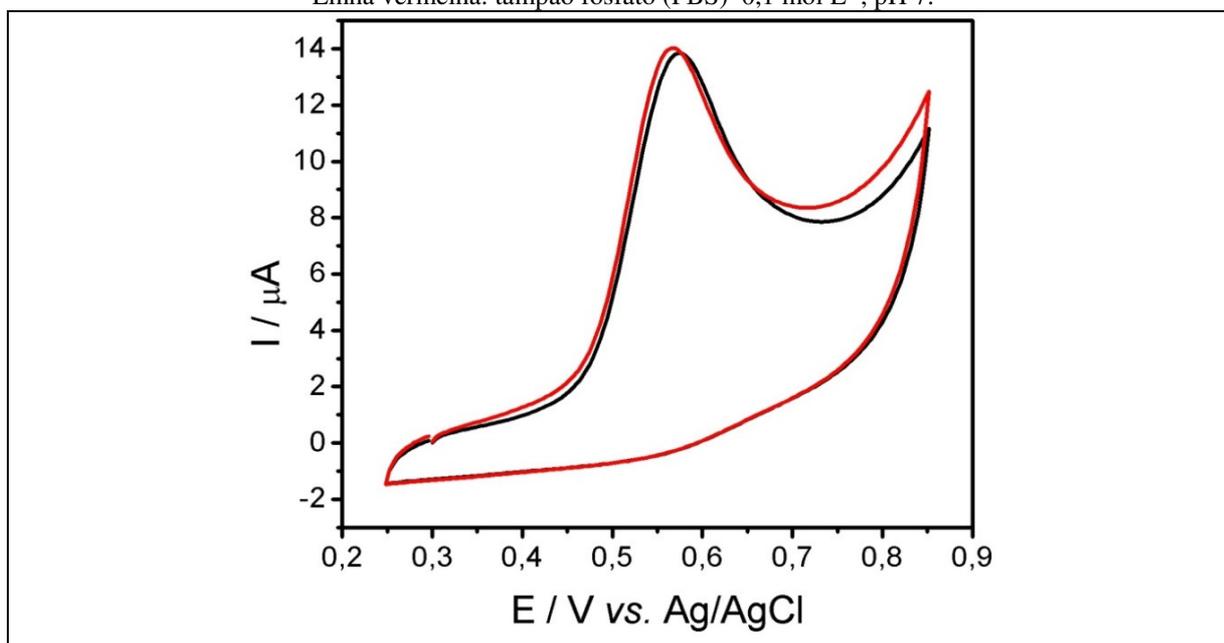
Outro parâmetro analisado foi a relação entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) em função do pH. Conforme observado na Figura 16, (gráfico I_{pa} vs pH), houve pouca variação da intensidade de I_{pa} com o aumento do pH até o valor de 7,0 e uma diminuição acentuada da intensidade de I_{pa} em valores de pH maiores do que 7,0. Para fins analíticos foi selecionado o valor de pH = 7,0.

5.5.3 Escolha do eletrólito suporte

A escolha do eletrólito de suporte é um parâmetro importante sobre a resposta eletroanalítica, uma vez que este influencia de forma direta na intensidade da corrente de pico. A escolha do eletrólito suporte pode modificar a cinética dos processos de eletrodo, o coeficiente de difusão da espécie eletroativa, a espessura da dupla camada, bem como condutividade da solução na célula eletroquímica (AGOSTINHO *et al.*, 2004).

A escolha do eletrólito suporte foi feita baseada no estudo do pH. Como o objetivo da metodologia foi determinar estriol em amostras reais, tais como formulação farmacêutica e urina humana, optou-se por utilizar um sistema tampão que ofereça uma máxima capacidade tamponante próxima ao pH = 7,0. Portanto, foi avaliada a influência de dois sistemas tampões que atendem a esse requisito (tampão BR e tampão fosfato, ambos a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). A Figura 18 apresenta os voltamogramas para a escolha do melhor tampão.

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos do estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes soluções de eletrólito suporte utilizando o poly(Met)Co/GCE, ($\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$). Linha preta: tampão Britton-Robinson (BR) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7. Linha vermelha: tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.



É possível observar que tanto o tampão fosfato (PBS) quanto o tampão Britton-Robinson (BR) apresentaram intensidade de I_{pa} e perfil voltamétrico similares para a oxidação eletroquímica do estriol. Contudo, considerando outros aspectos, como a praticidade e a facilidade de preparo, o tampão PBS apresenta maior vantagem por seu preparo ser mais simples por demandar menos tipos de reagentes. Por esta razão, o tampão PBS foi escolhido para análises posteriores.

5.6 Estudos da influência da velocidade de varredura no perfil voltamétrico do estriol sobre a superfície do poly(Met)Co/GCE

De acordo com Brett (1993) é possível caracterizar o processo redox em superfícies de eletrodos planos ou esféricos através da técnica de voltametria cíclica, tomando como parâmetro de análise a influência da velocidade de varredura (v) nas correntes e potenciais relativos ao analito. Estudos adicionais relativos à reação redox do estriol sobre o poly(Met)Co/GCE foram realizados pela variação da velocidade de varredura de uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ em um intervalo de 10 a 200 mV s^{-1} a fim de caracterizar a reação eletroquímica. O estudo da variação da velocidade de varredura é mostrado na Figura 19.

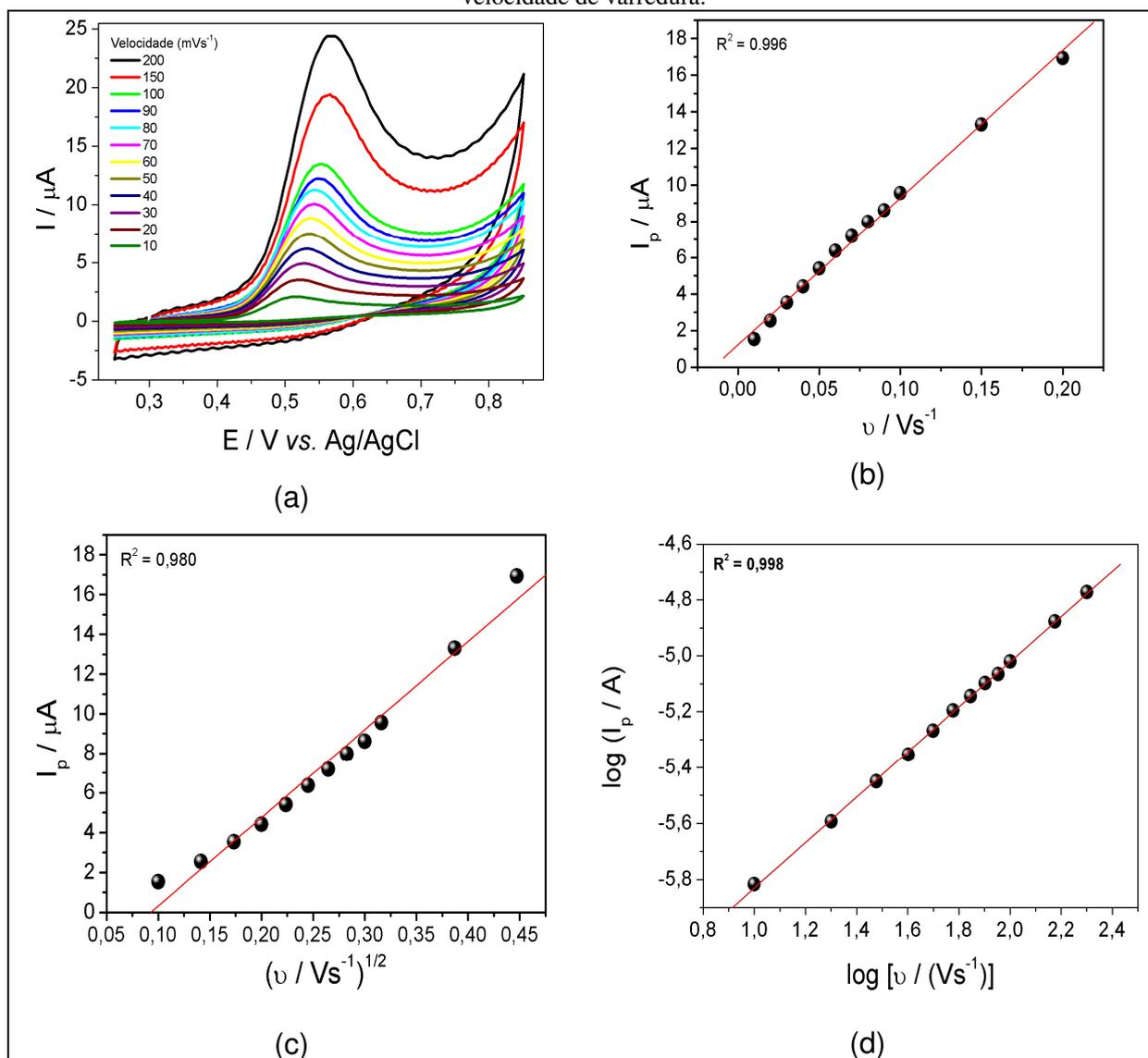
O perfil de oxidação do estriol no poly(Met)Co/GCE apresenta uma dependência da velocidade de varredura, o que fornece importantes informações sobre comportamento eletroquímico da molécula. Como pode ser visto na Figura 19.a, o potencial de pico referente à oxidação do estriol é deslocado $30/\alpha n \text{ mV}$ para potenciais mais positivos com o aumento de dez vezes na velocidade de varredura, confirmando o caráter irreversível para sua reação de oxidação (SHOOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP, 1990).

A corrente de pico de oxidação do estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7$), variou linearmente com a velocidade de varredura em um intervalo de 10 a 200 mVs^{-1} ($R^2 = 0,996$ – Figura 19.b). Entretanto, foram observadas respostas similares para as correntes de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($R^2 = 0,980$ – Figura 19.c). Diante dos resultados apresentados, pressupõe-se que a boa linearidade, em ambos os casos, indica que a reação é limitada por processos de adsorção e/ou difusão na região interfacial do poly(Met)Co/GCE.

Os valores de coeficiente linear encontrados foram diferentes de zero. Este resultado pode ser um indicativo da presença de processos de adsorção (BROCENSCHI *et al.*,

2014). Em alguns casos, os eletrodos de carbono vítreo apresentam um processo de adsorção significativo, o que explicaria o melhor coeficiente de correlação para o gráfico I_p vs. v .

Figura 19 - (a) Voltamogramas cíclicos para o estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7, obtidos empregando o poly(Met)Co/GCE em diferentes velocidades de varredura. (b) Dependência da corrente de pico de oxidação com a velocidade de varredura. (c) Dependência da corrente de pico de oxidação com a raiz quadrada da velocidade de varredura. (d) Logaritmo da corrente de pico de oxidação em função do logaritmo da velocidade de varredura.



Para demonstrar se a etapa determinante que controla a velocidade da reação é dada por adsorção ou difusão, um gráfico de $\log I_p$ vs. $\log v$ foi obtido para o poly(Met)Co/GCE (Figura 19.d). Obteve-se uma relação linear, sendo a equação correspondente: $\log I = (-4,212 \pm 0,008) + (0,809 \pm 0,006)\log v$ ($R^2 = 0,998$). De acordo com a literatura, valores de coeficiente angular da reta igual a 1 indicam que o processo é controlado por adsorção, enquanto que valores igual a 0,5 indicam que o processo é

controlado por difusão (BARD e FAULKNER, 2001; BRETT, 1993). O valor de inclinação obtido foi de 0,809, indicando que a etapa determinante que controla a velocidade da reação é a adsorção. O coeficiente de transferência de elétrons, α , também foi calculado usando Equação 8, válida para sistemas irreversíveis (BARD, A.J., FAULKNER, 2001). Os valores de E_p e $E_{p/2}$ foram obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 até 200 mV s^{-1}) e a diferença média dos potenciais (51 mV) foi usada para determinar o valor experimental de α para o poly(Met)Co/GCE, que foi de 0,48.

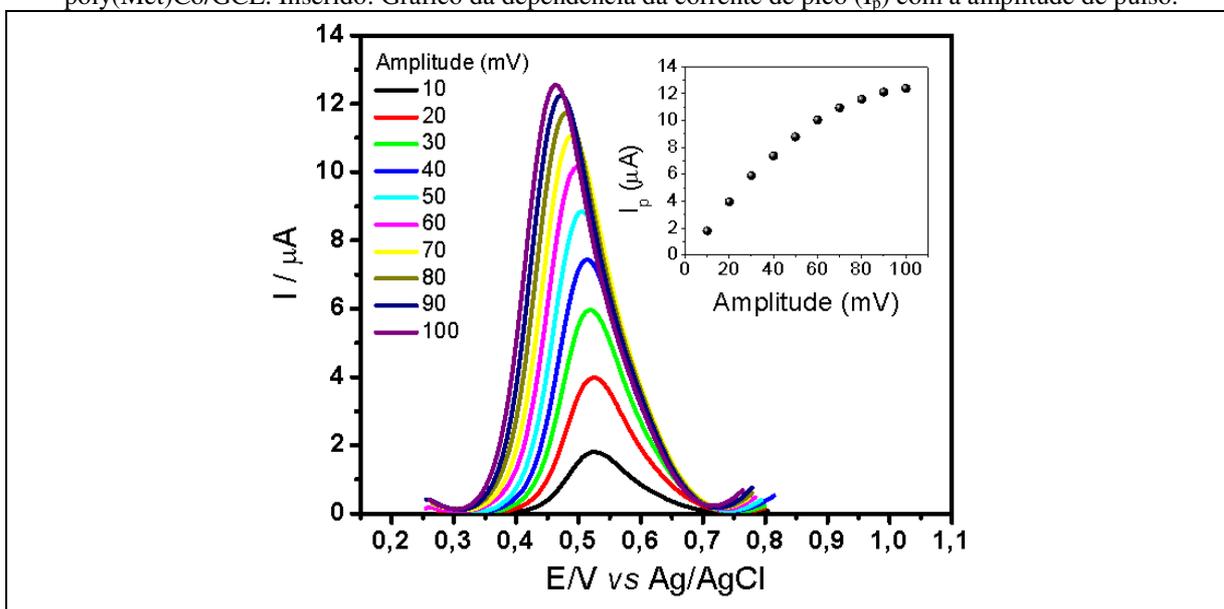
5.7 Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

No desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica, é de grande importância a otimização dos parâmetros experimentais que podem influenciar na resposta eletroquímica do analito sobre o eletrodo. Assim, para desenvolver um método eletroanalítico empregando a voltametria de pulso diferencial (DPV), faz-se necessário o estudo de alguns parâmetros: a amplitude de pulso (a) e a velocidade de varredura (ν).

5.7.1 Estudo da variação da amplitude de pulso

A Figura 20 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$, empregando o poly(Met)Co/GCE, a $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ num intervalo de amplitude do pulso de 10 a 100 mV.

Figura 20 - Voltamogramas de pulso diferencial de uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, obtidos em diferentes valores de amplitude de pulso, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, empregando o poly(Met)Co/GCE. Inseto: Gráfico da dependência da corrente de pico (I_p) com a amplitude de pulso.

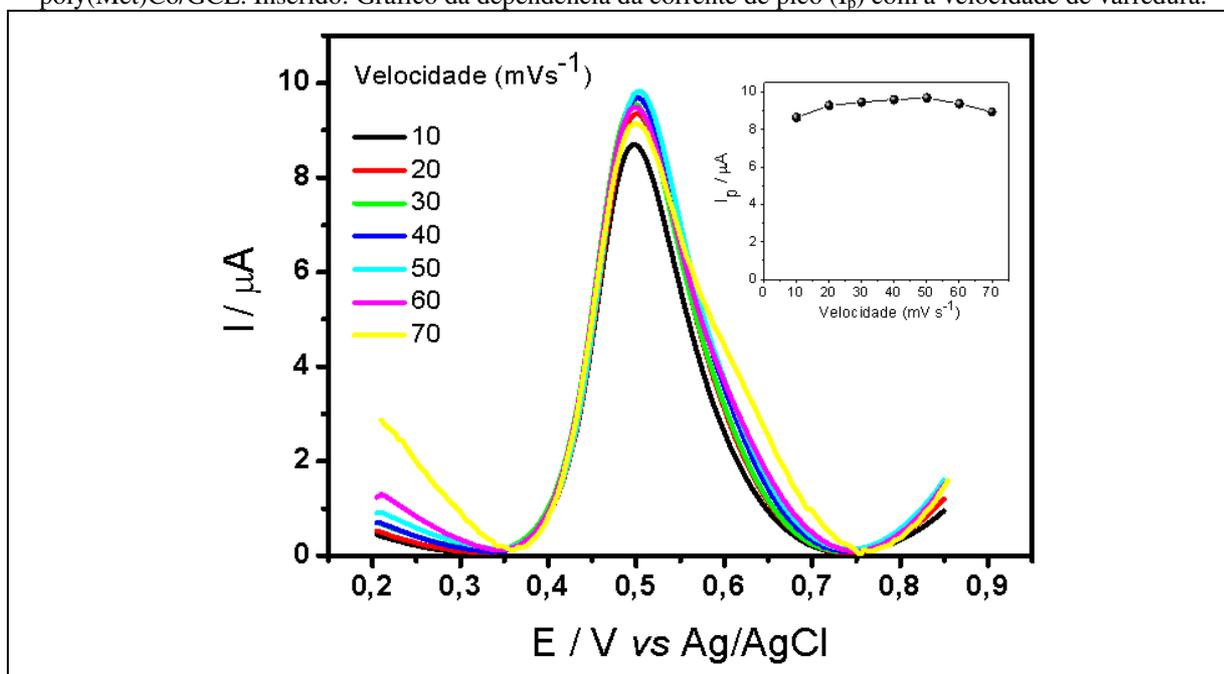


É possível observar nesta figura que ocorreu um incremento da magnitude da I_{pa} com o aumento da amplitude de pulso, juntamente com um deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos. No entanto, juntamente ao aumento de I_{pa} ocorreu também um aumento na largura dos picos, resultando em uma diminuição da resolução do sinal voltamétrico. Analisando o gráfico inserido na Figura 20, nota-se uma linearidade do aumento de I_{pa} em função da amplitude de pulso até 60 mV. Por conseguinte, este foi o valor escolhido para as demais medidas realizadas por DPV.

5.7.2 Estudo da variação da velocidade de varredura

O estudo do efeito da velocidade de varredura (v) sobre o sinal voltamétrico do estriol obtido por DPV também foi realizado. A Figura 21 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7, a uma amplitude (a) de 60 mV, empregando o poly(Met)Co/GCE, no intervalo de velocidade de varredura de 10 a 70 mV s^{-1} .

Figura 21 - Voltamogramas de pulso diferencial de uma solução de estriol $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7, obtidos em diferentes velocidades de varredura, $a = 60 \text{ mV}$, empregando o poly(Met)Co/GCE. Inserido: Gráfico da dependência da corrente de pico (I_p) com a velocidade de varredura.



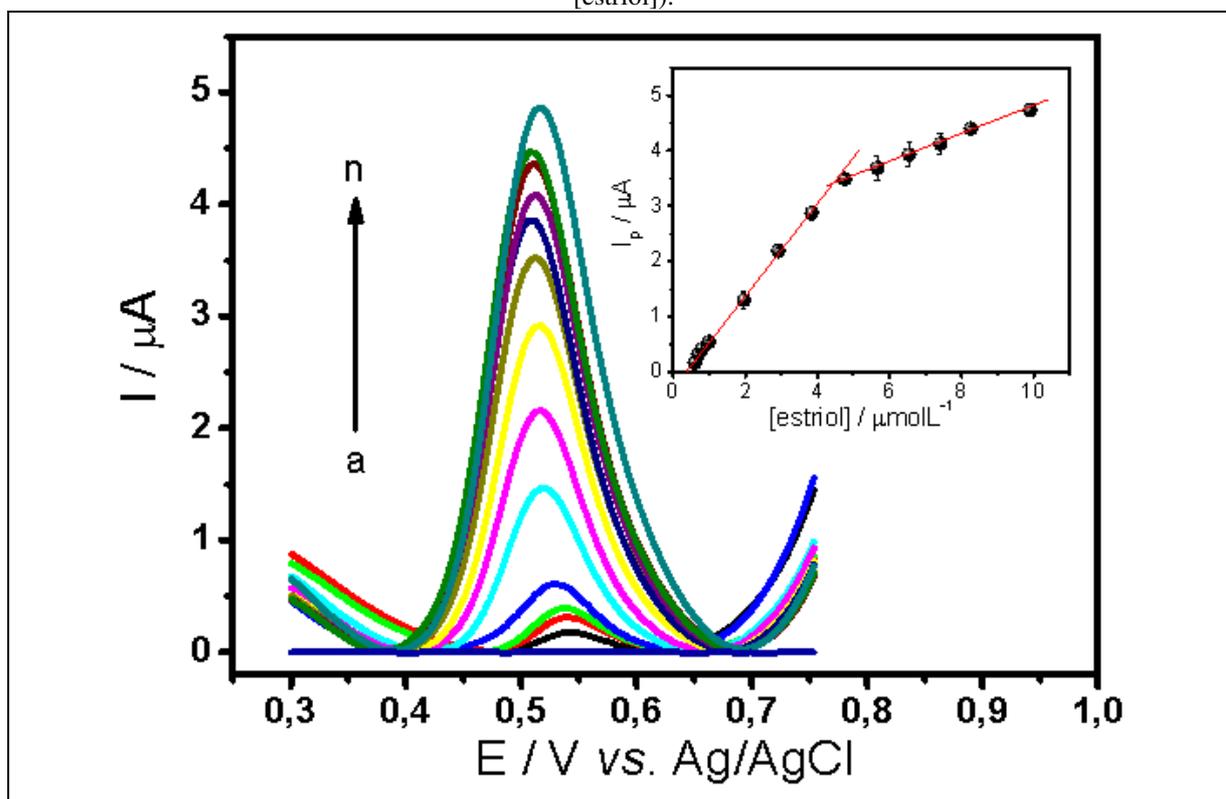
Verifica-se na Figura 21 que o potencial de pico praticamente não variou e também que houve somente um pequeno incremento da magnitude da I_p , com o aumento da v ,

como pode ser observado no gráfico de I_p vs v , inserido na Figura 21. Este pequeno incremento no valor da I_p foi observado somente para os valores de v de 10 a 50 mV s^{-1} . Para valores de v maiores que 50 mV s^{-1} , a intensidade de I_{pa} diminuiu e, portanto, esta velocidade de varredura foi escolhida para o desenvolvimento de um método de análise de estriol utilizando a DPV.

5.8 Construção da curva analítica para a determinação de estriol

Depois de otimizados os parâmetros da técnica de DPV para o processo de oxidação do estriol sobre a superfície do poly(Met)Co/GCE, tais como $a = 60 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, uma curva analítica foi construída por meio de adições de solução padrão $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol na célula eletroquímica contendo 10,0 mL de tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7$), e foram registrados os voltamogramas. As medidas voltamétricas foram realizadas em um intervalo de potencial entre 0,25 e 0,80 V. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

Figura 22 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7$) pela oxidação do estriol em diferentes valores de concentrações: 0,00 (a), 0,596 (b), 0,695 (c), 0,794 (d), 0,990 (e), 1,96 (f), 2,91 (g), 3,85 (h), 4,76 (i), 5,66 (j), 6,54 (k), 7,41 (l) $8,26$ (m) e $9,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ (n) empregando o poly(Met)Co/GCE, com $a = 60 \text{ mV}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Gráfico inserido: Curva analítica (I_p vs [estriol]).



A Figura 22 mostra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a construção da curva analítica. A concentração de estriol foi variada no intervalo de 0,596 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} (pH = 7). Na inserção da Figura 22 encontra-se a curva analítica que é um gráfico da média das correntes de pico (I_p) vs. a concentração de estriol. É possível observar que existe uma relação proporcional entre a corrente I_p e a concentração do estriol em dois intervalos distintos de concentração: 0,60 μmolL^{-1} – 4,76 μmolL^{-1} e 5,66 μmolL^{-1} – 9,90 μmolL^{-1} .

Diante deste resultado, é possível pressupor que exista o envolvimento de etapas de adsorção que em baixos valores de concentração não altera a cinética do processo redox na superfície do eletrodo. Entretanto, para valores elevados de concentração, ocorre o decaimento nos valores de intensidade de corrente de pico em decorrência do bloqueio da superfície do eletrodo pela espécie eletroativa.

A relação entre a I_p e a [estriol] mostrada na curva analítica inserida na Figura 22 é expressa pela Equação 9 (para o intervalo entre 0,60 μmolL^{-1} – 4,76 μmolL^{-1}) e pela Equação 10 (para o intervalo entre 5,66 μmolL^{-1} – 9,90 μmolL^{-1}).

$$I_p (\mu\text{A}) = -3,012 \times 10^{-7} (\pm 1,489 \times 10^{-8}) + 0,836 (\pm 0,013) [\text{E3}] / (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (9)$$

$$I_p (\mu\text{A}) = 2,293 \times 10^{-6} (\pm 1,743 \times 10^{-7}) + 0,253 (\pm 0,022) [\text{E3}] / (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (10)$$

Uma medida bastante usada para verificar a linearidade da curva de calibração é a análise do valor do quadrado do coeficiente de correlação (R^2). R^2 deve estar o mais próximo de 1 para representar um verdadeiro ajuste linear (HARRIS, 1992). Neste trabalho, obteve-se linearidades resultantes das curvas analíticas descritas pelas equações 9 e 10 com valores satisfatórios ($R^2 = 0,996$ e $0,994$, respectivamente).

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração de um analito que pode ser detectada, porém não quantificada (BRITO *et al.*, 2003). O limite de quantificação (LOQ) foi também calculado. Este parâmetro, por sua vez, representa o desempenho ou a sensibilidade do instrumento utilizado para análise. É definido como a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRITO *et al.*, 2003).

A curva analítica compreendida na faixa de concentrações de 0,596 μmolL^{-1} – 4,76 μmolL^{-1} (Figura 22) apresentou maior sensibilidade. Portanto, esta foi utilizada para o cálculo dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Os limites de detecção e de quantificação obtidos neste trabalho para o hormônio estriol foram de $3,40 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} e

$1,13 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados indicam que o método desenvolvido apresenta valores de LOD e LOQ menores ou semelhantes a outros métodos voltamétricos já descritos na literatura, além da alta sensibilidade analítica ($0,836 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$), o que comprova sua viabilidade na determinação de estriol.

5.9 Estudos de repetibilidade intradia e interdia

Com o propósito de avaliar a precisão do método desenvolvido, foram realizadas medidas em três níveis de concentrações ($3,0$, $5,0$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) dentro do intervalo da curva analítica. A repetibilidade intradia para a detecção de estriol sobre o poly(Met)Co/GCE foi realizada com seis medidas sucessivas ($n = 6$) no mesmo dia. Para o estudo da repetibilidade interdia, o registro dos voltamogramas foi realizado em seis dias diferentes.

Tabela 4 - Valores de corrente de pico anódica (I_{Pa}), corrente de pico anódica média ($I_{PaMédia}$) e desvio padrão relativo (DPR) das seis medidas realizadas no mesmo dia para as concentrações $3,0$, $5,0$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol.

Repetibilidade intradia								
[estriol] μmolL^{-1}	I_{Pa} / (μA) referentes ao número da medida						$I_{PaMédia}$ / (μA)	DPR %
3	2,20	2,22	2,15	2,26	2,06	2,05	2,16	4,00
5	3,39	3,23	3,22	3,28	3,23	3,27	3,27	1,94
10	4,50	4,67	4,57	4,43	4,69	4,68	4,59	2,37

Tabela 5 - Valores de corrente de pico anódica (I_{Pa}), corrente de pico anódica média ($I_{PaMédia}$) e desvio padrão relativo (DPR) das medidas realizadas em seis dias diferentes para as concentrações $3,0$, $5,0$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol.

Repetibilidade interdia								
[estriol] μmolL^{-1}	I_{Pa} / (μA) referentes ao número da medida						$I_{PaMédia}$ / (μA)	DPR %
3	2,15	2,22	2,29	2,20	2,41	2,20	2,25	4,13
5	3,52	3,68	3,55	3,57	3,39	3,58	3,55	2,66
10	4,81	4,69	4,84	4,95	4,69	4,76	4,79	2,11

Analisando as Tabelas 4 e 5, constata-se que tanto a repetibilidade intradia quanto a interdia, em todos os níveis de concentrações estudados, apresentaram desvios padrões relativos inferiores a $5,0 \%$, o que mostra, portanto, a boa estabilidade e repetibilidade da

resposta de corrente para a oxidação do estriol sobre o poly(Met)Co/GCE, confirmando que o método desenvolvido para determinação de estriol com este eletrodo apresenta boa precisão.

5.10 Determinação de estriol em amostras reais

5.10.1 Estudos de interferentes

Buscando avaliar a seletividade do método, realizou-se um estudo das substâncias que são potencialmente interferentes e que comumente estão presentes na urina humana (ácido úrico, ácido ascórbico e ácido cítrico) e em formulações farmacêuticas (lactose, estearato de magnésio e amido). As soluções dessas substâncias estudadas foram preparadas na relação (estriol:interferente) de 1:100 em condições previamente otimizadas (tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ e pH = 7,0) com a concentração fixa de estriol de 4,8 μmol L⁻¹.

As medidas foram realizadas em triplicata de forma a apresentar maior confiabilidade aos resultados obtidos. As correntes de pico anódicas mensuradas na presença dos interferentes foram monitoradas e comparadas com as correntes de pico anódicas obtidas a partir de uma solução de estriol sem interferentes, chegando então a uma resposta relativa.

Tabela 6 - Efeito de alguns possíveis compostos interferentes na determinação de estriol. [composto interferente adicionado] = 0,48 mmol L⁻¹, [E3] 4,8 μmol L⁻¹, n=3.

Substâncias interferentes	Resposta relativa (%)
Lactose	96,83(±2,75)
Estearato de Mg	98,47(±0,86)
Amido	101,6(±2,30)
Ácido úrico	98,16(±1,55)
Ácido ascórbico	99,07(±0,37)
Ácido cítrico	98,34(±0,45)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, as respostas relativas para o estriol na presença dos interferentes estudados foram bem próximas a 100 %. Este resultado indica que nenhuma das substâncias testadas interfere de forma significativa na resposta eletroquímica do estriol sobre o poly(Met)Co/GCE, o que mostra que o método desenvolvido apresenta seletividade para determinação de estriol.

5.10.2 Determinação de estriol em um produto comercial farmacêutico

O método proposto foi aplicado na determinação de estriol em produtos farmacêuticos e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método espectrofotométrico descrito pela farmacopeia americana (USP 29). Esta, por sua vez, preconiza que cada amostra contenha um teor de estriol entre 97,0% a 102,0% da quantidade declarada no rótulo. Neste estudo, para cada método, as medidas foram realizadas em triplicada de forma a garantir maior confiabilidade aos resultados. A tabela 7 apresenta os resultados encontrados a partir das determinações por ambos os métodos.

Tabela 7 - Resultados da determinação de estriol em comprimidos obtidos pelo método proposto e pelo método oficial

Amostra	Quantidade declarada (mg/comprimido)	Método eletroquímico (mg/comprimido)	Método Oficial (mg/comprimido)
Comprimido	2,0	2,02(±0,03)	2,01(±0,025)

n=3

De acordo com os dados apresentados na Tabela 7, o teor de estriol determinado por ambos os métodos, eletroquímico e espectrofotométrico, está dentro dos limites especificados pela farmacopeia americana (USP 29).

5.10.3 Análise estatística empregando teste t de Student e teste F

Tomando como base o teste t de Student e o teste F (Fischer), realizou-se uma análise estatística entre as determinações das três replicatas de cada método. Trata-se de uma análise importante, uma vez que indica se os resultados da determinação de estriol por ambos os métodos, podem ser considerados diferentes ou não, estatisticamente. A Tabela 8 apresenta o resultado para essa análise.

Tabela 8 - Teor médio de estriol determinado pelo método oficial e pelo método proposto e resultados dos testes t de Student e teste F

Método	Quantidade encontrada (mg)	Média (mg)	Sd	t _{tab}	t _{calc}	F _{tab}	F _{calc}
Eletroquímico	2,04	2,02	±0,03	4,30	1,14	19	1,44
	1,99						
	2,04						
Oficial	1,99	2,01	±0,025	4,30	1,14	19	1,44
	2,01						
	2,04						

n=3

Após a aplicação dos testes t de Student e F, os valores calculados para o t (análise das médias) e F (análise das variâncias) mostraram-se menores do que os valores tabelados, para graus de liberdade igual a dois. Diante do resultado apresentado, é possível afirmar que não há diferença estatisticamente significativa, a 95% de confiança, para as duas médias utilizadas. Portanto, o método eletroquímico proposto neste trabalho pode ser utilizado como uma alternativa ao método espectrofotométrico para determinação de estriol em formulações farmacêuticas.

5.11 Testes de adição e recuperação

Estudos de adição e recuperação foram realizados para avaliar a exatidão do método desenvolvido para análise de formulação farmacêutica e de amostras de urina humana. A quantidade de estriol presente nas amostras foi estimada em triplicata. O método da adição de padrão foi empregado com a finalidade de minimizar o efeito da matriz. Os testes foram realizados em amostras farmacêuticas com a adição de três quantidades conhecidas de estriol (0,97; 1,92, e 2,86 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os testes para método desenvolvido para análise em urina foram realizados pela adição em uma célula eletroquímica de três quantidades conhecidas de estriol (0,96; 1,91 e 2,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$), na presença de urina. A porcentagem de recuperação foi calculada através da razão entre a concentração total de estriol (amostra + padrão adicionado) encontrada e a concentração total esperada multiplicada por 100. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 9 - Resultados obtidos do teste de adição e recuperação em amostras de urina humana e comprimidos

Urina Humana			
[E3] adicionado*	[E3] esperado*	[E3] encontrado*	Recuperação (%)
0	-	1,99($\pm 0,12$)	-
0,96	2,95	2,98($\pm 0,09$)	100,95($\pm 2,88$)
1,91	3,90	3,88($\pm 0,06$)	99,60($\pm 1,46$)
2,84	4,83	4,78($\pm 0,02$)	98,97($\pm 0,23$)
Comprimidos			
[E3] adicionado*	[E3] esperado*	[E3] encontrado*	Recuperação (%)
0	-	1,98($\pm 0,03$)	-
0,97	2,95	2,98($\pm 0,14$)	100,87($\pm 4,68$)
1,92	3,90	3,95($\pm 0,08$)	100,21($\pm 2,12$)
2,86	4,84	4,68($\pm 0,01$)	97,70($\pm 0,35$)

* $\mu\text{mol L}^{-1}$, n=3

As recuperações variaram entre $97,7 \pm 0,3\%$ a $100,9 \pm 4,7\%$. Estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de estriol quando se empregou o procedimento analítico proposto. Também verifica-se a partir dos resultados apresentados na Tabela 9, que o método desenvolvido para a determinação de estriol utilizando o poly(Met)Co/GCE apresenta boa exatidão.

5.12 Comparações com outros métodos descritos para análise de estriol

Uma comparação do método eletroquímico desenvolvido neste trabalho com métodos previamente descritos na literatura para análise de estriol em amostras reais também foi realizada. A comparação foi realizada com base em alguns parâmetros escolhidos como: eletrodo utilizado, técnica, intervalo linear de concentração, limite de detecção e o tipo de amostra analisada. A Tabela 10 apresenta um resumo do comparativo dos métodos descrito na literatura.

Como pode ser observado na referida tabela, o método desenvolvido neste trabalho apresentou-se um intervalo linear e limite de detecção comparável com outros métodos já descritos na literatura, ratificando a possibilidade do emprego do poly(Met)Co/GCE para determinação de estriol em amostras farmacêuticas e de urina.

Tabela 10 - Comparação de algumas características do método analítico proposto para determinação de estriol com características de outros métodos analíticos descritos na literatura.

Eletrodo	Técnica	Intervalo Linear (mol L ⁻¹)	Limite de Detecção (mol L ⁻¹)	Amostra	Ref.
rGO-SbNPs	DPV	$2,0 \times 10^{-7} - 1,4 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-10}$	Água natural de uma barragem	(CESARINO; CINCOTTO; MACHADO, 2015)
MMIPs NPs/CPE	CV	$6,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-7}$	Água de lago	(ZHU; CAO; CAO, 2014)
BDD	SWV	$2,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-7}$	Formulações farmacêuticas e amostras de urina de mulheres grávidas	(SANTOS et al., 2010)
Ni-GCE	CV	$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-7}$	Amostras ambientais (água e sedimentos) e em água potável.	(MUNA et al., 2011)
Pt/MWNTs/GCE	SWV	$1,0 \times 10^{-5} - 7,5 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-7}$	Soro sanguíneo	(LIN; LI, 2006)
Lac/rGO/Sb ₂ O ₅ /GCE	Amperometria	$2,5 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-8}$	Amostras de urina	(WEN et al., 2012)
poly(Met)Co/GCE	DPV	$0,60 \times 10^{-6} - 4,76 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-8}$	Comprimidos e urina	Este trabalho

rGO-SbNPs: nanopartículas reduzidas de óxido de grafeno-antimônio; DPV: voltametria de pulso diferencial; Ni/Co/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanoflocos de óxido de cobalto de níquel (Ni/Co). VC: voltametria cíclica; BDD: eletrodo de diamante dopado com boro; SWV: voltametria de onda quadrada; Ni-GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com níquel; Pt/MWNTs/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e *nanoclusters* de Pt; Lac/rGO/Sb₂O₅/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com laccase e nanopartículas reduzidas de óxido de grafeno e antimônio.

5.13 Validação e considerações finais do método proposto para análise de estriol em formulações farmacêuticas

Para verificar o desempenho da metodologia eletroanalítica foram analisados os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), sensibilidade, exatidão e precisão de acordo com recomendações de guias, resoluções e artigos da literatura (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

No que diz respeito à avaliação dos parâmetros relacionados com a exatidão do método proposto, foram alcançados baixos valores de desvios padrões relativos (RSD) referentes aos teores de estriol determinados pelo método proposto e pelo método espectrofotométrico, além de resultados satisfatórios nos estudos de adição e recuperação realizados. Comprovou-se também que não existe diferença estatisticamente significativa (teste t de Student e teste F, ambos a 95% de confiança) entre os resultados obtidos nas determinações de estriol pelo método proposto e método espectrofotométrico nas amostras de produtos farmacêuticos analisadas. Desta forma, pode-se sugerir que o método voltamétrico proposto apresenta exatidão adequada para a análise do hormônio estriol investigado neste trabalho.

Quanto à precisão do método eletroquímico, os resultados obtidos nos estudos de repetibilidade intradia e repetibilidade interdia apresentaram valores de desvio padrão relativos referentes às correntes de pico (I_p) obtidas em ambos os testes inferiores a 5,0 %, que é o valor máximo recomendado pela Resolução nº 899 da ANVISA (2003). Portanto, o método proposto apresentou precisão satisfatória na determinação de estriol.

Após os estudos para avaliar a seletividade do método, constatou-se que as substâncias interferentes que são comumente encontradas em urina humana e em formulações farmacêuticas contendo estriol, não afetaram de forma significativa a quantificação desse fármaco em comprimidos e urina humana. Sendo assim, comprova-se a seletividade do método proposto na análise desses tipos de amostras.

Por meio da análise da regressão linear obtida através do método dos mínimos quadrados, constatou-se que há uma correlação linear significativa entre I_{pa} e a concentração de estriol. Os valores de R encontrados (0,998 e 0,997) referente aos intervalos de 0,596 μmolL^{-1} a 4,76 μmolL^{-1} e 5,66 μmolL^{-1} a 9,90 μmolL^{-1} , respectivamente, indicam que aproximadamente 99,8% das correntes de pico determinadas nos intervalos de concentração estudados, podem ser representadas pelas relações lineares entre a I_p e a concentração de

estriol apresentadas anteriormente (Equações 9 e 10). Por conseguinte, o método possui linearidade nos intervalos de concentração estudados.

Analisando os parâmetros relacionados à sensibilidade analítica, linearidade, LOD e LOQ, observa-se que os resultados foram satisfatórios, uma vez que eles apresentaram-se similares ou ainda melhores do que outros métodos descritos na literatura para análise de estriol em amostras reais. Como descrito anteriormente, a curva analítica compreendida na faixa de concentrações de $0,596 \mu\text{molL}^{-1}$ a $4,76 \mu\text{molL}^{-1}$ (Figura 22) apresentou maior sensibilidade ($0,836 \mu\text{A}/\mu\text{molL}^{-1}$) e foi utilizada para o cálculo dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).

A Tabela 11 descreve os resultados dos parâmetros analíticos analisados para o método eletroquímico proposto. Tais resultados ratificam que o método foi validado e, portanto, pode ser utilizado como uma alternativa aos métodos cromatográficos e espectrofotométricos para a determinação de estriol em formulações farmacêuticas e urina humana.

Tabela 11 - Parâmetros analíticos utilizados para validação do método proposto na determinação de estriol

Parâmetro analítico	Teste utilizado	Resultado
Exatidão	Adição e recuperação	Próximos a 100%
	Testes estatísticos para comparação com o método oficial	Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados
Precisão	Repetibilidade intradia	
	3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR = 4,00%
	5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR = 1,94%
	10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR = 2,37%
Repetibilidade interdia		
3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR = 4,13%	
5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR = 2,66%	
10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPR = 2,11%	
Seletividade	Estudo de interferentes	Satisfatório
Sensibilidade	-	$0,836 \mu\text{A}/\mu\text{molL}^{-1}$
LOD	-	$3,40 \times 10^{-8} \text{molL}^{-1}$
LOQ	-	$1,13 \times 10^{-7} \text{molL}^{-1}$
Faixa Linear	-	$0,60 \mu\text{molL}^{-1} - 4,76 \mu\text{molL}^{-1}$ $5,66 \mu\text{molL}^{-1} - 9,90 \mu\text{molL}^{-1}$

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi descrito um estudo voltamétrico do hormônio estriol por voltametria cíclica e o desenvolvimento de uma metodologia de análise utilizando a voltametria de pulso diferencial para a determinação de estriol em formulação farmacêutica e em urina humana utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com L-metionina e cobalto, o poly(Met)Co/GCE.

O processo de oxidação do estriol sobre superfície do poly(Met)Co/GCE investigado por voltametria cíclica, foi caracterizado como irreversível e controlado por predominantemente por adsorção. Esse processo mostrou-se dependente do pH do eletrólito de suporte, comportando-se como um sistema nernstiano, onde houve a participação de um mesmo número de prótons e elétrons na reação de oxidação ($2H^+$ e $2e^-$). A correlação dos resultados diagnosticados no processo eletródico em relação àqueles encontrados na literatura sobre o comportamento eletroquímico do estriol e de compostos similares a este hormônio, confirmam as evidências apresentadas neste estudo.

O método desenvolvido foi aplicado satisfatoriamente na determinação de estriol em amostras de comprimidos farmacêuticos e urina humana de forma direta. Não houve necessidade de tratamento prévio das amostras, que é uma vantagem para o método proposto.

Com relação à avaliação dos parâmetros para validação do método eletroquímico proposto, este, por sua vez, foi considerado exato; pois apresentou resultados satisfatórios nos estudos de adição e recuperação do analito nas amostras analisadas, além da comprovação de que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados referentes à quantidade de estriol encontrado e aquele que foi determinado pelo método oficial.

Quanto ao estudo dos interferentes, os resultados comprovaram que os compostos normalmente encontrados na urina e em formulações farmacêuticas contendo estriol (diluídos 100 vezes) não comprometeram a determinação do fármaco nessas matrizes. Esse resultado ratifica a seletividade do método proposto para a determinação do estriol.

O método eletroquímico proposto para a determinação de estriol em comprimidos e urina humana apresentou características desejáveis para um método analítico, tais como simplicidade, baixo custo, resultados exatos e reprodutíveis, seletividade, sensibilidade.

O efeito de matriz foi minimizado, uma vez que devido à alta sensibilidade do método desenvolvido, foram necessárias pequenas quantidades de amostra.

Como perspectiva futura, propõe-se aplicar o método desenvolvido para a determinação de estriol no sangue de pacientes que estejam fazendo uso deste fármaco, de

forma a realizar o monitoramento das concentrações plasmáticas ao longo do tratamento. Outra possibilidade é a aplicação do método para o monitoramento do perfil de degradação do estriol em amostras de águas em redes de tratamento de esgoto.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, S. M. L. *et al.* O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813–817, 2004.
- ALVES, V. A.; SILVA, L. A. DA; BOODTS, J. F. C. Electrochemical impedance spectroscopic study of dimensionally stable anode corrosion. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 28, n. 9, p. 899–905, 1998.
- ANDRÁSI, N. *et al.* The role of the acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and cholic acids by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 45, p. 8264–8272, 11 nov. 2011.
- ANVISA. **Bulário Eletrônico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/>. Acesso em 01 maio 2017.
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**, p. 1–15, 2003.
- ARAÚJO JÚNIOR, N. L. C.; ATHANAZIO, D. A. Hormone replacement therapy and endometrial cancer. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 23, n. 11, p. 2613–2622, 2007.
- BARD, A.J., FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2. ed. New York: [s.n.].
- BEAUSSE, Johanne. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 753–761, 2004.
- BEITOLLAHI, H. *et al.* Electrochemical behavior of a carbon paste electrode modified with 5-amino-3', 4'-dimethyl-biphenyl-2-ol/carbon nanotube and its application for simultaneous determination of isoproterenol, acetaminophen and N-acetylcysteine. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 220–226, 2012.
- BEITOLLAHI, H.; MOSTAFAVI, M. Nanostructured base electrochemical sensor for simultaneous quantification and voltammetric studies of levodopa and carbidopa in pharmaceutical products and biological samples. **Electroanalysis**, v. 26, n. 5, p. 1090–1098, 2014.
- BEITOLLAHI, H.; SHEIKHSHOAIE, I. Electrocatalytic and simultaneous determination of isoproterenol, uric acid and folic acid at molybdenum (VI) complex-carbon nanotube paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 27, p. 10259–10263, 2011a.
- BEITOLLAHI, H.; SHEIKHSHOAIE, I. Electrocatalytic oxidation and determination of epinephrine in the presence of uric acid and folic acid at multiwalled carbon nanotubes/molybdenum (VI) complex modified carbon paste electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 8, p. 1810–1814, 2011b.

BERGAMINI, M. F.; SANTOS, D. P.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical behavior and voltammetric determination of pyrazinamide using a poly-histidine modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 690, p. 47–52, 2013.

BERGAMINI, M. F. **Eletrodos impressos modificados com poli-histidina aplicados na construção de sensores eletroquímicos para crômio (VI) e fármacos**. Araraquara: UNESP, 2007, 24 p. tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2007.

BÍBLIA. A. T. I Coríntios. In: BÍBLIA. Português. Bíblia sagrada: contendo o antigo e o novo testamento. Tradução de João Ferreira de Almeida. Rio de Janeiro: Sociedade Bíblica do Brasil, 1966.

BODZEK, M.; DUDZIAK, M. Removal of natural estrogens and synthetic compounds considered to be endocrine disrupting substances (EDs) by coagulation and nanofiltration. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 1, p. 35-40, 2006.

BOOPATHI, M.; WON, M.-S.; SHIM, Y.-B. A sensor for acetaminophen in a blood medium using a Cu(II)-conducting polymer complex modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, n. 2, p. 191–197, 2004.

BRADLEY, L. A. *et al.* Undetectable maternal serum unconjugated estriol levels in the second trimester: risk of perinatal complications associated with placental sulfatase deficiency. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 176, n. 3, p. 531–535, 1997.

BRETT, Christopher *et al.* **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. 1993.

BRITO, N. M. *et al.* Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BROCENSCHI, R. F. *et al.* 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, 2014.

BUSTER, J. E. *et al.* Serum unconjugated estriol levels in the third trimester and their relationship to gestational age. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 125, n. 5, p. 672–676, 1976.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

CESARINO, I.; CINCOTTO, F. H.; MACHADO, S. A. S. A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 210, p. 453–459, 2015.

CHEEMALAPATI, S.; DEVADAS, B.; CHEN, S.-M. Highly sensitive and selective determination of pyrazinamide at poly-L-methionine/reduced graphene oxide modified electrode by differential pulse voltammetry in human blood plasma and urine samples. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 418, p. 132–139, 2014.

CHERVENAK, J. Bioidentical hormones for maturing women. **Maturitas**, v. 64, n. 2, p. 86–89, 2009.

CHEUNG, K. C. *et al.* Transition metal complexes as electrocatalysts-Development and applications in electro-oxidation reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 17–20, p. 2367–2385, 2007.

CINCOTTO, F. H. *et al.* Reduced graphene oxide-Sb₂O₅ hybrid nanomaterial for the design of a laccase-based amperometric biosensor for estriol. **Electrochimica Acta**, v. 174, p. 332–339, 2015.

CINCOTTO, F. H. **Detecção dos interferentes endócrinos estradiol e estriol em amostras ambientais e clínicas empregando eletrodos modificados com grafeno, nanopartículas metálicas e quantum dots**. Universidade de São Paulo, 2016.

DA SILVA, F. L. O. *et al.* Determination of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles by differential pulse voltammetry at glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 182, p. 929–934, 2015.

EMAMI, M.; SHAMSIPUR, M.; SABER, R. Design of poly-L-methionine-gold nanocomposit/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for determination of amlodipine in human biological fluids. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, n. 4, p. 985–992, 2014.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 5. ed. p. 1537-1539. Strasbourg: EDQM, 2005.

FERRAZ, B. R. L. *et al.* Voltammetric Determination of Ethionamide in Pharmaceutical Formulations and Human Urine using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 4, p. 677–684, 2016.

FERRAZ, B. R. L.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A. R. Highly sensitive electrocatalytic determination of pyrazinamide using a modified poly (glycine) glassy carbon electrode by square-wave voltammetry. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2509–2516, 2016a.

FERRAZ, B. R. L.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A. R. Simultaneous determination of ethionamide and pyrazinamide using poly (L-cysteine) film-modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 154, p. 197–207, 2016b.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

FILES, J. A.; KO, M. G.; PRUTHI, S. Bioidentical Hormone Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 7, p. 673–680, jul. 2011.

FLOR, S. *et al.* Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 19, p. 3305–3313, 2010.

FLOREA, A. *et al.* Electrochemical sensor for the detection of estradiol based on electropolymerized molecularly imprinted polythioaniline film with signal amplification using gold nanoparticles. **Electrochemistry Communications**, v. 59, p. 36–39, 2015.

FONSECA, A. P.; LIMA, D. L. D.; ESTEVES, V. I. Degradation by Solar Radiation of Estrogenic Hormones Monitored by UV–Visible Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 215, n. 1, p. 441–447, 2011.

FONSECA, A. M. DA *et al.* **Ginecologia endócrina: manual de normas**. [s.l.] Roca, 2004.
FU, H.-J. *et al.* Application of nickel cobalt oxide nanoflakes for electrochemical sensing of estriol in milk. **RSC Adv.**, v. 6, n. 70, p. 65588–65593, 2016.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GOEBELSMANN, U.; JAFFE, R. B. Oestriol metabolism in pregnant women. **Acta endocrinologica**, v. 66, n. 4, p. 679–693, 1971.

GORGA, M. *et al.* Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1352, p. 29–37, 25 jul. 2014.

GU, Y. *et al.* Biomimetic sensor based on copper-poly(cysteine) film for the determination of metronidazole. **Electrochimica Acta**, v. 152, p. 108–116, 2015.

GUPTA, V. K. *et al.* Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—a review. **Analytical biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 179–196, 2011.

GUMUSTAS, M.; OZKAN, S. A. The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 5, p. 1–21, 2011.

GUO-JIN, Z. *et al.* Magnetic microparticle chemiluminescence immunoassay method for determination of estriol in human urine. **CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 39, n. 1, p. 62–66, 2011.

GUO, T. *et al.* Rapid measurement of estrogens and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 736–741, 2008.

GUO, X. *et al.* Carbohydrate-based label-free detection of escherichia coli ORN 178 using electrochemical impedance spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 241–246, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Contração e Excitação do Músculo Liso. **Tratado de Fisiologia Médica**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

HAN, Q. *et al.* Magnetic sensing film based on Fe₃O₄@Au-GSH molecularly imprinted polymers for the electrochemical detection of estradiol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 180–186, 2016.

HARRIS, D. C. **Análisis Químico Cuantitativo**. 1. ed. México D. F.: [s.n.].

HUANG, X. *et al.* Measurement of unconjugated estriol in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and assessment of the accuracy of chemiluminescent immunoassays. **Clinical Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 260–268, 2014.

HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B. Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 172–177, 15 mar. 2008.

INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia e Normalização e Qualidade Industrial**, p. 25, 2007.

JAPANESE Pharmacopoeia. XVI. ed. Tokio. Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011.

JIN, G.-P.; LIN, X.-Q. Voltammetric behavior and determination of estrogens at carbamylcholine modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 16–17, p. 3556–3562, 30 maio 2005.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, n. 2, p. 163–173, 2000.

K'OWINO, I. O.; SADIK, O. A. Impedance spectroscopy: A powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. **Electroanalysis**, v. 17, n. 23, p. 2101–2113, 2005.

KATZENELLENBOGEN, B. S. Biology and receptor interactions of estriol and estriol derivatives in vitro and in vivo. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 20, n. 4 PART 2, p. 1033–1037, 1984.

KUMAR, A. K.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Sorptive removal of endocrine-disruptive compound (estriol, E3) from aqueous phase by batch and column studies: Kinetic and mechanistic evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 820–828, 2009.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. In: **Métodos cromatográficos de análise**. [s.l.] Rima, 2004. v. 6.

LASIA, A. Impedance of porous electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 397, n. 1–2, p. 27–33, 1995.

LASIA, A. Nature of the two semi-circles observed on the complex plane plots on porous electrodes in the presence of a concentration gradient. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 500, n. 1, p. 30–35, 2001.

LAURIA-PIRES, A. **Estudo do Perfil Salivar e Sérico em Gestantes e Não-gestantes**, DF, 87 folhas. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, 2008.

LI, Y. et al. Highly sensitive Fe₃O₄ nanobeads/graphene-based molecularly imprinted electrochemical sensor for 17 β-estradiol in water. **Anal Chim Acta**, v. 884, p. 106–113, 2015.

LI, Y.; LIU, X.; WEI, W. Square wave voltammetry for selective detection of dopamine using polyglycine modified carbon ionic liquid electrode. **Electroanalysis**, v. 23, n. 12, p. 2832–2838, 2011.

LIN, X.; LI, Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 2, p. 253–259, 2006.

LISBOA, N. S. *et al.* A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters. **Talanta**, v. 117, p. 168–175, 15 dez. 2013.

LÓPEZ DE ALDA, M. J. *et al.* Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **The Analyst**, v. 127, n. 10, p. 1299–1304, 2 out. 2002.

LU, J. *et al.* Isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry method for the analysis of alkylphenols, bisphenol A, and estrogens in food crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1258, p. 128–135, 2012.

LUO, L. *et al.* Electrochemical sensing platform of natural estrogens based on the poly(l-proline)-ordered mesoporous carbon composite modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 187, p. 78–83, 2013.

MA, W.; SUN, D. M. The electrochemical properties of dopamine, epinephrine and their simultaneous determination at a poly(L-methionine) modified electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1382–1389, 2007.

MARTINS, M. A. D. *et al.* Qualidade de vida em mulheres na pós-menopausa, usuárias e não usuárias de terapia hormonal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, p. 196–202, 2009.

MASOUD, M. S.; EI-HAMID, O. H. A. Structural chemistry of amino acid complexes. **Transition Metal Chemistry**, v. 14, p. 233–234, 1989.

MEENAKSHI, S. *et al.* Enhanced amperometric detection of metronidazole in drug formulations and urine samples based on chitosan protected tetrasulfonated copper phthalocyanine thin-film modified glassy carbon electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 136–144, 2016.

MIRANDA, L. *et al.* Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. **Quim. Nova**, v. 38, n. 3, p. 419–426, 2015.

MUNA, G. W. *et al.* Electrocatalytic oxidation of estrogenic phenolic compounds at a nickel-modified glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 23, n. 12, p. 2915–2924, 2011.

MURRAY, R. W. Chemically modified electrodes. In: BARD, A. J. (Ed.). *Electroanalytical chemistry of advances*. New York: Marcel Decker, 1984, v. 13, p. 191-351.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; CUCHILLO, C. **Lehninger princípios de bioquímica**. [s.l.] Omega, 2009.

OJANI, R. *et al.* Simultaneous and sensitive detection of dopamine and uric acid using a poly(L-methionine)/gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, n. 3, p. 423–429, 2014.

OJANI, R.; ALINEZHAD, A.; ABEDI, Z. A highly sensitive electrochemical sensor for simultaneous detection of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(L-methionine) modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 188, p. 621–630, 2013.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; DE ALMEIDA, V. G.; RITTA, A. G. S.; AUCÉLIO, R.Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PANG, H. *et al.* Uniform manganese hexacyanoferrate hydrate nanocubes featuring superior performance for low-cost supercapacitors and nonenzymatic electrochemical sensors. **Nanoscale**, v. 7, n. 38, p. 16012–16019, 2015.

PATTIMAKIEL, L.; THACKER, H. L. Bioidentical hormone therapy: Clarifying the misconceptions. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 78, n. 12, p. 829–836, 2011.

PEPE, G. J.; ALBRECHT, E. D. Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. **Endocrine reviews**, v. 16, n. 5, p. 608, 1995.

PEREIRA, T. M. M. **Caracterização térmica TG/DTG, DTA, DSC, DSC-fotovisual de hormônios bioidênticos estriol e estradiol**. 104 folhas. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

PEREIRA, E. R. C. V. **Investigação eletroquímica e aplicação de eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de poli-L-lisina na determinação de antioxidantes**. 2010. 148 folhas. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

PIWOWARSKA, J.; RADOWICKI, S.; PACHECKA, J. Simultaneous determination of eight estrogens and their metabolites in serum using liquid chromatography with electrochemical detection. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 275–280, 2010.

RAIMUNDO, C. C. M.; **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia, SP**. 126 folhas. 2007. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REYES-ROMERO, M. A. The physiological role of estriol during human fetal development is to act as antioxidant at lipophilic milieu of the central nervous system. **Medical hypotheses**, v. 56, n. 1, p. 107–109, 2001.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.

RICÓVERI, F. A. Receptores de estrógenos em posmenopáusicas. 2008.

SANTOS, K. D. *et al.* Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1999–2006, 2010.

SANTOS, K. D. **Determinação eletroanalítica dos hormônios estriol e estrona em amostras de formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e alimentos**. 133 folhas. 2013. Tese (Doutorado em Química), Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F. L.; CROUCH, S. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. Cengage Learning, 2013.

SHOUTHAMPTON ELECTROCHEMISTRY GROUP. **Instrumental Methods in Electrochemistry**. 2.ed. New York: Ellis Horwood, 1990. p178.

SIEKMANN, L. Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: a definitive method in clinical chemistry. **Journal of steroid biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 117–123, 1979.

SILVA, M. F. C. G. Voltametria Cíclica—Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reações Induzidas por Transferência Electronica. **Técnicas Experimentais**, v. 70, p. 20-6, 1998.

SONG, J.; YANG, J.; HU, X. Electrochemical determination of estradiol using a poly(L-serine) film-modified electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 38, n. 6, p. 833–836, 2008.

SPEROFF, L.; FRITZ, M. A. **Clinical gynecologic endocrinology and infertility**. lippincott. Williams & wilkins, 2005.

TAGAWA, N. *et al.* Simultaneous determination of estriol and estriol 3-sulfate in serum by column-switching semi-micro high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 723, n. 1–2, p. 39–45, 19 fev. 1999.

TANG, Y. *et al.* A direct competitive inhibition time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of unconjugated estriol in serum of pregnant women. **Anal. Methods**, v. 5, n. 16, p. 4068–4073, 2013.

TORRES, N. H. **Monitoração de resíduos dos hormônios 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba**. 116 folhas. 2009. Dissertação. (Mestrado Centro de Energia Nuclear na Agricultura), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

USP 29. THE UNITED STATES Pharmacopeia. 29 ed. 2006.

VEGA, D. *et al.* Electrochemical detection of phenolic estrogenic compounds at carbon nanotube-modified electrodes. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1031–1038, 2007.

VIEIRA-NETO, E.; ZINGONI, L. F.; FONSECA, A. A. Triploidia Fetal Associada à Diminuição da Subunidade β e do Estriol Não-Conjugado no Soro Materno Relato do Caso. **RBGO**, v. 21, n. 4, p. 235–238, 1999.

VON BRANDIS H. J.; **Anatomia e Fisiologia para profissionais da equipe de saúde**; editora Pedagógica e Universitária LTDA; São Paulo; vol 3; 95-105; 1977.

WANG, S. *et al.* Electrochemical Enzyme-Linked Immunoassay for the Determination of Estriol Using Methyl Red as Substrate. **Analytical Letters**, v. 39, n. 5, p. 947–956, 1 maio 2006.

WANG, S. *et al.* On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 194–201, 14 jan. 2008.

WANG, J. Decentralized electrochemical monitoring of trace metals: from disposable strips to remote electrodes. Plenary lecture. **Analyst**, v. 119, n. 5, p. 763–766, 1994.

WANG, J. Modified electrodes for electrochemical sensors. **Electroanalysis**, v. 3, n. 4-5, p. 255-259, 1991.

WEN, T. *et al.* Reduced graphene oxide-platinum nanoparticles composites based imprinting sensor for sensitively electrochemical analysis of 17β -estradiol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 682, p. 121–127, 2012.

XU, X. *et al.* Quantitative Measurement of Endogenous Estrogens and Estrogen Metabolites in Human Serum by Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 20, p. 7813–7821, 2007.

XUE, T. *et al.* [Establishment of the dot immunoenzyme filtration assay for quantitative detection of estriol]. **Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology**, v. 29, n. 8, p. 874–876, 2013.

YARON, Y. *et al.* Second-trimester maternal serum marker screening: Maternal serum α -fetoprotein, β -human chorionic gonadotropin, estriol, and their various combinations as predictors of pregnancy outcome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181, n. 4, p. 968–974, out. 1999.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545–551, 2002.

ZAHAR, S. E. V *et al.* Qualidade de vida em usuárias e não usuárias de terapia de reposição hormonal. **Rev Assoc Med Bras**, v. 51, n. 3, p. 133–138, 2005.

ZARE, H. R.; SOBHANI, Z.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Electrocatalytic oxidation of hydroxylamine at a rutin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode: Improvement of the catalytic activity. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 126, n. 2, p. 641–647, 2007.

ZHU, L.; CAO, Y.; CAO, G. Electrochemical sensor based on magnetic molecularly imprinted nanoparticles at surfactant modified magnetic electrode for determination of bisphenol A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 258–261, 2014.

ZUO, X.; ZHANG, H.; LI, N. An electrochemical biosensor for determination of ascorbic acid by cobalt (II) phthalocyanine-multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 1074–1079, 2012.

ANEXO A - TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

ARTIGOS PUBLICADOS

Gelson T. S. T. da Silva, Kele T. G. Carvalho, Osmando F. Lopes, Eliziana S. Gomes, Andréa R. Malagutti, Valmor R. Mastelaro, Caue Ribeiro, and Henrique A. J. L. Mourão. Synthesis of ZnO nanoparticles assisted by N-sources and their application in the photodegradation of organic contaminants. **ChemCatChem**, 2017. DOI: 10.1002/cctc.201700756.

ANEXO B - TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

GOMES, E. S.; MOURÃO, H. A. J. L.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A.R. Determinação voltamétrica de estriol em formulação farmacêutica utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de poli(metionina)-cobalto. Trabalho apresentado na modalidade pôster no XXI SIBEE – **Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Natal, RN, 2017.

GOMES, E. S.; SILVA, G. T. S. T.; CARVALHO, K. T. G.; LOPES, O. F.; OLIVEIRA, C. R.; MOURÃO, H. A. J. L.; MALAGUTTI, A.R. Síntese e caracterização de nanopartículas de ZnO e sua aplicação na fotodegradação de hormônios. Trabalho apresentado na modalidade pôster no V SINTEGRA UFVJM – **Semana da Integração Ensino, Pesquisa e Extensão**, Diamantina, MG, 2017.

FERRAZ, B. R. L.; PARANHOS, T. R.; GOMES, E. S.; DE SOUZA, L. C. C.; FERREIRA, G. S.; SOUSA, A. N.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A.R. Eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs/Cu[(Dimpy)Cl] PF6 para determinação simultânea de epinefrina e ácido úrico. Trabalho apresentado na modalidade pôster no XXI SIBEE – **Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Natal, RN, 2017.

DE SOUZA, L. C. C.; FERRAZ, B. R. L.; GOMES, E. S.; PARANHOS, T. R.; FERREIRA, G. S.; SOUSA, A. N.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A.R. Obtenção de um eletrodo modificado com eletropolímero do indicador vermelho fenol para aplicação na determinação simultânea de paracetamol e 4-aminofenol. Trabalho apresentado na modalidade pôster no V SINTEGRA UFVJM – **Semana da Integração Ensino, Pesquisa e Extensão**, Diamantina, MG, 2017.

PARANHOS, T. R.; FERRAZ, B. R. L.; GOMES, E. S.; DE SOUZA, L. C. C.; FERREIRA, G. S.; SOUSA, A. N.; LEITE, F. R. F.; MALAGUTTI, A.R. Oxidação eletrocatalítica e determinação simultânea de epinefrina e ácido úrico usando eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs/Cu[(Dimpy)Cl]PF6. Trabalho apresentado na modalidade pôster no V SINTEGRA UFVJM – **Semana da Integração Ensino, Pesquisa e Extensão**, Diamantina, MG, 2017.