

Keliana Dantas Santos

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DOS HORMÔNIOS
ESTRIOL E ESTRONA EM AMOSTRAS DE FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS, FLUIDOS BIOLÓGICOS E ALIMENTOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Keliana Dantas
DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DOS HORMÔNIOS ESTRIOL E
ESTRONA EM AMOSTRAS DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, FLUIDOS
BIOLÓGICOS E ALIMENTOS / Keliana Dantas Santos ;
orientador, Almir Spinelli - Florianópolis, SC, 2013.
133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Eletroanalítica. 3. Diamante dopado com
boro. 4. Desreguladores endócrinos. I. Spinelli, Almir. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

Keliana Dantas Santos

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DOS HORMÔNIOS
ESTRIOL E ESTRONA EM AMOSTRAS DE FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS, FLUIDOS BIOLÓGICOS E ALIMENTOS**

Banca Examinadora:

Prof. Almir Spinelli, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Cícero do Nascimento, Dr.
Relator
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Reinaldo Simões Gonçalves, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Cristiane Luisa Jost, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Iolanda Cruz Vieira, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Química.

Florianópolis, 9 de julho de 2013.

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, equilíbrio e discernimento para prosseguir nesta caminhada.

Aos meus pais, João e Ivonete e minhas irmãs Dayana e Lucyana pelo apoio e por acreditarem em mim.

A minha sobrinha Maria Eduarda pelas perguntas e observações dignas do mais alto escalão filosófico.

Ao companheiro Alexandre pelos empurrões necessários, pelo auxílio nos momentos extremos e pela presença mesmo na ausência.

Ao professor, orientador e incentivador Almir Spinelli, pelos ensinamentos, pela dedicação, atenção, orientação e, também, pela paciência.

Aos professores Magno Aparecido Gonçalves Trindade, Gustavo Amadeu Micke, Marcus César Mandolesi Sá e Valdir Soldi, pelas grandes contribuições ao meu trabalho no exame de qualificação.

Aos professores Paulo Cícero do Nascimento, Reinaldo Simões Gonçalves, Luiz Augusto dos Santos Madureira e a professora Cristiane Luisa Jost pelas enriquecedoras correções na defesa pública do trabalho.

Ao professor Eudésio Oliveira Vilar (UFCG – Campina Grande) por abrir as portas de seu laboratório para o término da parte experimental deste trabalho.

As amigas Alice, Mica, Marina e Angela por serem minha família em Florianópolis.

Aos (as) amigos (as) de laboratório, Camila, Iolana, Giovana, Márcia, Ana Cláudia, Otoniel, Fernando, Gabriel, Éder pelo companheirismo de todas as horas.

Aos secretários do curso Jadir e Grace pela presteza nos encaminhamentos e informações prestadas.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pela concessão da bolsa de estudos.

Em um jardim, todos os seres estão inter-relacionados. Existem apenas e tão somente porque existem outros seres que lhes dão sustento, que os apoiam. A rosa que floresce dependeu da abelha que a polinizou, dependeu do solo que lhe deu o sustento, dependeu da chuva que a molhou. E, quando morrer, será a fonte de novas vidas que viverão nesse jardim. Da mesma forma, nós não vivemos isolados. Estamos, sempre, em correlação com os outros e com todas as vidas do universo. Somos parte desse conjunto, como uma nota de uma sinfonia, portanto, agradeço de coração, a todos e todas que de forma direta ou indireta, teceram comigo a teia da vida...

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e aplicações práticas de metodologias eletroanalíticas por voltametria de onda quadrada (VOQ) utilizando eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação dos hormônios sexuais femininos estriol e estrona em amostras de urina, formulação farmacêutica e de produtos lácteos. Em solução de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) o estriol e a estrona oxidaram em potenciais de 0,43 e 0,48 V, respectivamente, apresentando uma boa definição do pico. Usando as melhores condições otimizadas da VOQ, a curva analítica para o estriol foi linear no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9994$), com um limite de detecção de $1,72 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e de quantificação de $7,98 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. As recuperações do estriol variaram de 100 – 102% para a amostra de formulação farmacêutica, e 100 – 103% para a amostra de urina de gestante, indicando ausência de efeitos de interferência de matriz significativos. A exatidão da metodologia eletroanalítica proposta foi comparada com a do método padrão de radioimunoensaio. Os valores para o erro relativo entre os métodos propostos e padrão foram 6,79% para a determinação de estriol no produto comercial e 4,74% em uma amostra de urina de gestante. Os resultados obtidos sugerem um método confiável além de uma alternativa para determinação eletroanalítica de estriol em produtos farmacêuticos e amostras de urina de gestante. A metodologia proposta para determinação de estrona também apresentou bons resultados. A faixa linear de trabalho obtida pela curva de calibração foi de $4,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9988$), com limites de detecção e quantificação de $1,3 \times 10^{-8}$ e $3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. As recuperações da estrona em amostra de leite tipo B variaram de 106 – 109%, para a amostra de manteiga foram de 105 – 109% e para a amostra de nata de 107 – 111%. A exatidão desta metodologia eletroanalítica quando comparada com o método padrão de radioimunoensaio apresentou valores para erros relativos entre ambos os métodos de -7,51, -0,92 e -6,62%, para as determinações em amostras de leite, manteiga e nata, respectivamente. Todos esses resultados confirmam que as metodologias propostas são ferramentas viáveis, precisas e exatas para a determinação dos hormônios sexuais femininos estriol e estrona em fluido biológico, formulação farmacêutica e produtos lácteos.

Palavras-chave: Eletroanalítica. diamante dopado com boro. estriol. estrona.

ABSTRACT

This work describes the development and practical applications of electroanalytical methodologies by square wave voltammetry (SWV) using boron-doped diamond electrode for the determination of female sex hormones estriol and estrone in urine samples, pharmaceutical formulation and dairy products. In NaOH solution $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12.0), estriol and estrone oxidized in potential of 0.43 and 0.48 V, respectively, showing a good definition peak. Using the best optimized conditions of SWV, the calibration curve was linear for estriol in the concentration range of 2.0×10^{-7} to $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0.9994$), with a detection limit of $1.72 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and quantification limit of $7.98 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Recoveries of estriol were in the range of 100 to 102%, for the pharmaceutical sample, and 100 – 103% for the urine sample, indicating no significant matrix interference effects on the analytical results. The accuracy of the electroanalytical methodology proposed was compared to that of the radioimmunoassay method. The values for the relative error between the proposed and standard methods were 6.79% for the determination of estriol in the commercial product and 4.74% in a urine sample taken during pregnancy. The results obtained suggest a reliable and alternative method for electroanalytical determination of estriol in pharmaceutical products and urine samples taken during pregnancy. The proposed methodology for determination of estrone also showed good results. The linear response range obtained by the calibration curve was 4.0×10^{-8} and $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0.9988$), with detection and quantification limits 1.3×10^{-8} and $3.8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. The recoveries of estrone into milk sample ranged from 106 to 109% for butter sample were 105.21 to 108.88% and for sample cream 107 to 111%. The accuracy of this electroanalytical methodology compared to the standard method of radioimmunoassay showed values for relative errors between both methods of -7.51, -0.92 and -6.62% for the determinations in samples of milk, butter and cream, respectively. All these results confirm that the proposed methodologies are viable, precise and accurate for the female sex hormones, estrone and estriol, determination in a biological fluid, pharmaceutical formulation and dairy products.

Keywords: Electroanalysis. boron-doped diamond. estriol. estrone.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura química dos estrógenos (a) estriol e (b) estrona..... 27
- Figura 2: (a) Forma da aplicação da voltametria cíclica (b) Voltamograma cíclico para um sistema reversível. 50
- Figura 3: (a) Representação da aplicação do pulso na voltametria de onda quadrada; (b) Voltamograma de onda quadrada. 54
- Figura 4: Célula eletroquímica utilizada para realização dos experimentos. a) eletrodo de diamante dopado com boro; b) eletrodo de Ag/AgCl e c) placa de platina. 60
- Figura 5: Voltamogramas obtidos para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando o eletrodo de carbono vítreo (c) e o EDDB (d) onde (a e b) são o branco. 66
- Figura 6: Voltamogramas cíclicos ($\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$) do estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes soluções e pHs usando EDDB: (6.A) (a) tampão Britton-Robinson (pH 2,0); (b) tampão acetato (pH 4,5); (c) tampão Britton-Robinson (pH 7,0); (6.B) (d) tampão amônia (pH 9,4), (e) tampão Ringer (pH 12,0), (f) tampão Britton-Robinson (pH 12,0), e (g) NaOH (pH 12,0)..... 67
- Figura 7: Influencia do pH sobre o potencial de oxidação do estriol utilizando tampão Britton-Robinson como eletrólito suporte. 69
- Figura 8: Voltamogramas cíclicos para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), ν (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90, (j) 100, (k) 150 e (l) 200 mV s^{-1} 71
- Figura 9: Variação da j com $\nu^{1/2}$ para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). 71
- Figura 10: Variação do $\log j$ com $\log \nu$ para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). 72

Figura 11: Variação da função corrente ($jv^{-1/2}$) com v para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).	73
Figura 12: Mecanismo de reação proposto para a oxidação eletroquímica do estriol.	74
Figura 13: Dependência da densidade de corrente anódica com (A) frequência em $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, (B) amplitude em $f = 60 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e (C) incremento em $a = 40 \text{ mV}$ e $f = 60 \text{ Hz}$ obtido por voltametria de onda quadrada para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em EDDB imerso em NaOH (pH 12,0).	76
Figura 14: (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos após adições sucessivas de estriol, (B) curva de calibração construída a partir desses voltamogramas.	78
Figura 15: Curva de determinação eletroanalítica de estriol em formulação farmacêutica utilizando a metodologia proposta.	81
Figura 16: Curva de determinação eletroanalítica de estriol em urina de gestante utilizando a metodologia proposta.	84
Figura 17: Voltamogramas obtidos utilizando o EDDB (c) e carbono vítreo (b) na presença de estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e na ausência para ambos os eletrodos (a).	88
Figura 18: Influência do pH no potencial de oxidação da estrona utilizando tampão Britton–Robinson como eletrólito suporte.	89
Figura 19: Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) da estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes soluções e pH 12,0 usando EDDB (a) NaOH; (b) LiOH; (c) Britton–Robinson; (d) KOH; (e) Tampão Ringer.	90
Figura 20: Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) com estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodo EDDB imerso em soluções de NaOH $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes tempos de limpeza (a) 10; (b) 15; (c) 20; (d) 30; (e) 40 e (f) 50 s.	92

Figura 21: Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) da estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações do eletrólito suporte NaOH (pH 12,0) (a) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (b) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (c) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando EDDB.	94
Figura 22: Voltamogramas cíclicos para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodo EDDB imerso em solução de NaOH (pH 12), v (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90, (j) 100, (k) 150 e (l) 200 mV s^{-1}	95
Figura 23: Variação da j com $v^{1/2}$ para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).....	96
Figura 24: Variação de $\log j$ com $\log v$ para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).	97
Figura 25: Variação da função corrente ($jv^{-1/2}$) com v para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).....	98
Figura 26: Mecanismo de reação proposto para a oxidação eletroquímica da estrona.	99
Figura 27: Influência da variação da f sobre os valores de Δj para oxidação eletroquímica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do EDDB em NaOH.	100
Figura 28: Influência da variação da a sobre os valores de Δj para oxidação eletroquímica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do EDDB em NaOH.	101
Figura 29: Influência da variação da ΔE_s sobre os valores de Δj para oxidação eletroquímica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do EDDB em NaOH.	102
Figura 30: (A) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona em NaOH (pH 12,0): na ausência (a) e na presença de estrona (b) $4,0 \times 10^{-8}$; (c) $8,0 \times 10^{-8}$; (d) $4,0 \times 10^{-7}$; (e) $6,0 \times 10^{-7}$; (f) $8,0 \times 10^{-7}$; (g) $2,0 \times 10^{-6}$; (h) $6,0 \times 10^{-6}$; (i) $8,0 \times 10^{-6}$; (j) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando eletrodo de	

diamante dopado com boro ($f = 60$ Hz; $a = 50$ mV; $\Delta E_s = 4$ mV). (B)
Curva de calibração obtida a partir desses voltamogramas. 103

Figura 31: Dependência da Δj em função da concentração de estrona
para amostra de leite. 105

Figura 32: Dependência da Δj em função da concentração de estrona
para amostra de manteiga. 108

Figura 33: Dependência da Δj em função da concentração de estrona
para amostra de nata. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas e químicas relevantes dos esteroides avaliados	28
Tabela 2: Excreção diária (μg) de esteróides estrogênicos em humanos.	29
Tabela 3: Revisão dos últimos 5 anos sobre trabalhos de determinação dos estrogênios estriol e estrona.....	32
Tabela 4: Parâmetros extraídos dos voltamogramas de onda quadrada e da curva de calibração.....	79
Tabela 5: Resultados obtidos na determinação de estriol em formulação farmacêutica usando a metodologia proposta e do método oficial.	81
Tabela 6: Estudos de recuperação do estriol em formulação farmacêutica comercial.....	83
Tabela 7: Determinação de estriol em amostra de urina de gestante	84
Tabela 8: Estudos de recuperação do estriol em amostra de urina de gestante	85
Tabela 9: Estudo dos interferentes na determinação de estriol em urina	86
Tabela 10: Parâmetros de validação do método proposto para determinação de estrona.....	104
Tabela 11: Determinação de estrona em amostra de leite.....	106
Tabela 12: Estudos de recuperação de estrona em amostra de leite....	107
Tabela 13: Determinação de estrona em amostra de manteiga.	108
Tabela 14: Estudos de recuperação de estrona em amostra de manteiga.	109
Tabela 15: Determinação de estrona em amostra de nata.	110
Tabela 16: Estudos de recuperação de estrona em amostra de nata....	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

17 α -EE2 - 17 α -estradiol

17 β -E2 - 17 β -estradiol

2t - duração de pulso

a - amplitude de pulso

A - área do eletrodo

BDD - *boron-doped diamond*

C - concentração da espécie eletroativa no interior da solução

c⁰ - concentração superficial de espécies na superfície do eletrodo em um dado instante

CEC - *Commission of the European Communities*

CG/EM/EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CL/EM/EM - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas extração em EFS – Extração em fase sólida

CL/UV - cromatografia líquida com detecção ultra violeta

CL-APPI/MS/MS - cromatografia líquida de fotoionização à pressão atmosférica acoplada à espectrometria de massas

CL-ESI/MS/MS - cromatografia líquida de ionização (eletrospray) acoplada à espectrometria de massas

c_{Ox} - concentração superficial da espécie oxidada

CP-AFM - *Conductive Probe Atomic Force Microscopy*

c_{Red} - concentração superficial da espécie oxidada reduzida

D - coeficiente de difusão

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DES - Dietilstilbestrol

DNA - ácido desoxirribonucleico

D.P.R. – desvio padrão relativo

E^0 - potencial padrão

E1 - estrona

E3 - estriol

EDC - *endocrine disrupting chemicals*

EDDB - eletrodo de diamante dopado com boro

EPA - *United States Environmental Protection Agency*

E_{pa} - potencial de pico anódico

E_{pc} - potencial de pico catódico

f - frequência

F - constante de Faraday

HFCVD - Hot Filament-Chemical Vapor Deposition

i - corrente elétrica

I_{pa} - corrente de pico anódica

I_{pc} - corrente de pico catódica

k_h - constante de velocidade heterogênea

K_{ow} - coeficiente de partição octanol-água

MWCNTs - *glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes*

MWCVD ou CVD - *microwave chemical vapor deposition*

n - número de mols de elétrons transferidos na reação

PCB - bifenilas policloradas

R - constante dos gases

s - desvio-padrão

S - coeficiente angular

SECM - *scanning electrochemical microscopy*

SPME - *solid phase microextraction*

T – temperatura

v - velocidade de variação do potencial

VOQ – voltametria de onda quadrada

z - número inteiro de sinal e magnitude da carga iônica da espécie eletroativa

$\Delta E_{p/2}$ – largura do pico potencial a meia altura

ΔE_S - incremento de variação de potenciais

Δi - corrente resultante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	21
2.1.2 Estrogênios.....	26
2.1.3 Propriedades Físicas e Químicas dos Hormônios Estudados.....	27
2.1.4 Métodos para Determinação de Hormônios	30
2.1.5 Determinações Eletroanalíticas dos Estrogênios Estrona e Estriol.....	37
2.2 DIAMANTE DOPADO COM BORO.....	38
2.2.1 Aplicações do Eletrodo de Diamante Dopado com Boro na Eletroanalítica	41
2.3 MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS.....	44
2.3.1 Voltametria cíclica	49
2.3.2 Voltametria de onda quadrada	53
3 OBJETIVOS.....	56
3.1 OBJETIVO GERAL	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS.....	57
4.1.1 Reagentes	57
4.1.2 Soluções.....	57
4.1.3 Amostras	58
4.2 CÉLULA E ELETRODOS	59
4.3 INSTRUMENTOS.....	60

4.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO.....	61
4.5 ESTUDO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	62
4.5.1 Determinação de estriol em amostra de urina e formulação farmacêutica	62
4.5.2 Determinação de estrona em amostra de produtos lácteos.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1 ESTUDOS REFERENTES AO HORMÔNIO ESTRIOL	65
5.1.1 Escolha do eletrodo	65
5.1.2 Escolha do eletrólito suporte	67
5.1.3 Comportamento eletroquímico do estriol sobre eletrodo de EDDB em NaOH	70
5.1.4 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada	75
5.1.5 Curva de calibração e parâmetros de validação do método proposto para determinação de estriol.....	77
5.1.6 Determinação de estriol em um produto comercial farmacêutico	80
5.1.7 Estudos de interferentes e recuperação na determinação de estriol em um produto comercial farmacêutico.....	82
5.1.8 Determinação de estriol em urina de gestante e estudos de recuperação.....	83
5.1.9 Estudo de interferentes potenciais para a determinação de estriol em urina.....	85
5.2 ESTUDOS REFERENTES AO HORMÔNIO ESTRONA	88
5.2.1 Escolha do eletrodo	88
5.2.2 Escolha do pH e do eletrólito suporte.....	88
5.2.3 Tempo de limpeza do eletrodo	91
5.2.4 Concentração do eletrólito suporte.....	92
5.2.5 Comportamento eletroquímico da estrona sobre eletrodo EDDB em NaOH	94
5.2.6 Otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada	99
5.2.7 Curva de calibração e parâmetros de validação do método proposto para determinação de estrona.....	102

5.2.8 Determinação e recuperação de estrona em amostras de produtos lácteos.....	105
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais enfoques científicos internacionais da última década diz respeito à presença, no meio ambiente, de um grupo específico de compostos químicos caracterizado pela capacidade de simular ou alterar a atividade hormonal de humanos e de outros animais. Essas substâncias mimetizam a ação de hormônios naturais, inibindo-os ou alterando as funções regulares normais dos sistemas imunológico, nervoso e, principalmente, endócrino, e são chamadas de Desreguladores Endócrinos (CASTRO, 2002).

De acordo com Bila e Dezotti (2007), os desreguladores endócrinos são substâncias de uma categoria recente de poluentes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino. Essas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} e há indícios de que causam efeitos adversos à saúde animal mesmo apresentadas em concentrações baixas.

Estudos relativos à hipótese de que substâncias químicas no ambiente podem estar relacionadas a efeitos estrogênicos vêm sendo relatados desde 1923 (ALLEN E DOISY, 1923; BURLINGTON E LINDEMAN, 1950 *apud* BAKER, 2001). Entretanto, somente nos últimos 10 anos a preocupação de órgãos ambientais tornou-se mais evidente. Em função disso, foram desenvolvidos vários trabalhos com o objetivo de avaliar os efeitos adversos dessas substâncias à saúde humana e de outros animais.

A exposição a essas substâncias pode ocorrer a partir de uma variedade de fontes, de forma voluntária ou não. Assim, humanos e outros animais estão expostos a alguns fitoestrogênios com o consumo de água potável ou pelo contato com o ar e solo. Também estão expostos a muitos desreguladores endócrinos sintéticos ao utilizar produtos comerciais, como produtos de limpeza, pesticidas, aditivos alimentares e cosméticos (CASTRO, 2002).

Alguns agentes terapêuticos e farmacêuticos também estão na lista das substâncias classificadas como desreguladores endócrinos. São estrogênios sintéticos usados como contraceptivos orais, na reposição terapêutica na menopausa ou na prevenção do aborto, tais como, 17α -estradiol (17α -EE2), e os naturais, 17β -estradiol (17β -E2) estrona (E1) e estriol (E3).

Nos últimos anos, vários métodos analíticos têm sido relatados para a determinação desses compostos em matrizes ambientais aquosas. Esses métodos, majoritariamente, tratam de técnicas cromatográficas que exigem etapas preliminares como a derivatização e/ou pré-

concentração, além de fazerem uso de solventes orgânicos (em sua maioria tóxicos) e apresentarem alto custo.

Portanto, o desenvolvimento de técnicas de menor custo e, sobretudo, menos trabalhosas no sentido da diminuição da quantidade de etapas do processo, se faz emergente. Por apresentar essas características, a eletroanalítica se mostra como proposta viável.

Diante o exposto, o presente trabalho pretende propor metodologia de determinação eletroanalítica de hormônios sexuais, particularmente os estrógenos naturais estriol e estrona, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e a técnica de voltametria de onda quadrada.

A seguir, aborda-se, dividida em subitens, a fundamentação teórica, versando sobre: (a) os desreguladores endócrinos, estrógenos naturais e metodologias de quantificação destes encontrados na literatura, (b) eletrodo de diamante dopado com boro e sua aplicação na eletroanalítica e (c) técnicas voltamétricas. Também serão apresentados os objetivos geral e específicos, bem como a metodologia a ser empregada no desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, os capítulos trazendo os resultados obtidos pelas metodologias eletroanalíticas desenvolvidas, bem como os resultados dos métodos comparativos e, em seguida, as considerações finais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Os desreguladores endócrinos abrangem uma classe de substâncias com estruturas distintas, entre elas substâncias naturais, incluindo os hormônios, e uma grande quantidade de substâncias sintéticas. Algumas definições são propostas para essas substâncias, denominadas em inglês *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDC).

Alguns autores entendem que desreguladores endócrinos são apenas as substâncias que interagem com sítios receptores de hormônios, enquanto outros entendem como qualquer substância que cause desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino, independentemente se atua diretamente no sítio receptor ou não (BILA e DEZOTTI, 2007).

De acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos, EPA (do inglês, *United States Environmental Protection Agency*) (1998), um desregulador endócrino é definido como um *agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos* (tradução livre).

Segundo a CEC (do inglês, *Commission of the European Communities*) (1999), um *desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações* (tradução livre).

Para Preziosi (1998), os desreguladores endócrinos podem ser produtos naturais de origem animal ou vegetal, como os fitoestrógenos (isoflavonas, lignanos e coumestanos), produzidos por alguns vegetais como a soja; também podem ser compostos químicos sintéticos, em sua maioria organoclorados, com os mais variados usos industriais, comerciais e domésticos produzidos intencionalmente – caso dos solventes clorados e de inseticidas -, ou não - aparecendo como subproduto da atividade industrial – caso das dioxinas.

Embora algumas substâncias naturais de origem vegetal (os fitoestrogênios) possuam propriedades endócrinas, estas geralmente não causam tantos problemas aos seres humanos e outros animais quanto àquelas de origem antropogênica, uma vez que essas substâncias não se ligam fortemente aos receptores hormonais, sendo facilmente excretadas

e conseqüentemente, não se acumulam nos tecidos corpóreos (MEYER *et al.*, 1999).

Por outro lado, as substâncias sintéticas com ação desreguladora são geralmente persistentes no ambiente, acumulam-se no solo e nos sedimentos, são transportadas para outras regiões pela atmosfera e podem acumular-se ao longo da cadeia trófica, expondo os animais superiores a maiores riscos. Várias destas substâncias podem ser excretadas por meio do leite materno, constituindo-se, assim, uma fonte de contaminação para recém-nascidos (MEYER *et al.*, 1999). Os hormônios presentes em cosméticos e anabolizantes utilizados em rações animais também são considerados desreguladores endócrinos (ALVES *et al.*, 2007).

Diclorodifeniltricloroetano (DDT), bifenilas policloradas (PCB), bisfenol A, alquilfenóis-polietoxilatos, p-dioxina e dibenzofurano são exemplos de compostos sintéticos que possivelmente são desreguladores endócrinos. Bisfenol A é um componente comumente encontrado nos “vernizes” empregados em tratamentos dentários e em revestimentos internos de recipientes para embalagem de alimentos, facilitando a contaminação humana diretamente ou por ingestão dos alimentos contaminados (GASCON *et al.*, 1997).

Existem ainda outras classificações para as substâncias estrogênicas presentes no ambiente. Frequentemente são referidos como estrogênios ambientais, estrogênios exógenos ou exoestrogênios.

Exoestrogênios são diversos grupos de substâncias que não necessariamente apresentam alguma semelhança com a estrutura química natural do hormônio, mas causam respostas antagonicas, possivelmente através de mecanismos de ação via receptores hormonais. A atividade agonista é a capacidade de uma substância acoplar-se ao receptor de hormônios esteroides e elucidar uma resposta. Em contrapartida, a atividade antagonista é a habilidade de uma substância acoplar-se ao receptor de estrogênio e bloquear a ação do ligante natural (estrogênio) e, assim, sua resposta não será elucidada. Essas substâncias podem ser identificadas por sua capacidade de ligar-se ao receptor de estrogênios e induzir ou alterar uma resposta hormonal (ZACHAREWSKI, 1997). As substâncias sintéticas com atividade estrogênica também são denominadas de xenoestrogênios por alguns autores (DESBROW, *et al.*, 1998).

Segundo Skakkebaek (1998), desreguladores endócrinos podem afetar o sistema endócrino em diversos níveis. A síntese, o transporte, o

metabolismo e a excreção dos hormônios podem ser alterados por essas substâncias.

Os estrogênios têm sido classificados como os maiores contribuintes, dentre os desreguladores endócrinos, em provocar alterações endócrinas nos organismos presentes em águas superficiais (JOHNSON e SUMPTER, 2001; LAI, *et al.*, 2002; GOMES, *et al.*, 2004). Isso ocorre porque os estrogênios naturais e sintéticos são efetivos em níveis de ng L^{-1} , enquanto a maioria dos compostos químicos apresenta atividade estrogênica em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ e o sistema hormonal dos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações de esteróides, na ordem de partes por bilhão (ppb) ou partes por trilhão (ppt) (NOGUEIRA, 2003; ROUTLEDGE, *et al.*, 1998). Estrogênios naturais e sintéticos exibem atividade estrogênica na faixa de cem a um milhão de vezes maior que a apresentada por compostos químicos (ROUTLEDGE E SUMPTER, 1996; TANAKA, *et al.*, 2001), razão pela qual esses estrogênios causam anomalias em organismos aquáticos em baixíssimas concentrações.

O tempo e, principalmente, o período da vida em que o desregulador endócrino age sobre um organismo pode ser decisivo. Durante os primeiros estágios de vida, o desenvolvimento dos órgãos sexuais é controlado por hormônios sexuais. Portanto, quando a desregulação endócrina ocorre durante esse período, pode resultar em defeitos permanentes ou disfunção de órgãos. Por outro lado, em um organismo maduro, os hormônios estimulam ou inibem funções de órgãos, estando também envolvidos na formação de esperma e no ciclo feminino. Nessa etapa, os efeitos são reversíveis e podem ser cessados quando o desregulador não estiver presente.

Possivelmente, o desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, de útero e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento de incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas tireóides, distúrbios nas funções do ovário (crescimento folicular e a ovulação), na fertilização e gravidez, e efeitos neurocomportamentais podem ser induzidos por desreguladores endócrinos. Trabalhos publicados na literatura relatam que a exposição a estrogênios é o principal fator de risco para o desenvolvimento de endometriose (DASTON *et al.*, 1997; GRAY Jr., 1998; EPA, 1998; SOLOMON e SCHETTLER, 2000; COLEMAN *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm revelado que, nos últimos 60 anos, a contagem média de espermatozoides em alguns países diminuiu pela metade e dobrou a incidência de má formação do sistema reprodutivo

masculino, como hipospadias. A exposição de homens adultos a substâncias estrogênicas pode resultar em ginecomastia (crescimento das mamas) e interferência no funcionamento do sistema glandular associado ao hipotálamo-hipófise-gônadas, resultando em diminuição da libido, impotência, diminuição dos níveis de androgênios no sangue e diminuição na contagem de espermatozoides (WARING e HARRIS, 2005).

Os desreguladores endócrinos podem ainda provocar alteração do nível de hormônio da tireoide, provocando alterações no crescimento e desenvolvimento de humanos (EPA, 1998; HARRISON *et al.*, 1997). Relatos mostram que os estrogênios naturais (17β -estradiol) e os sintéticos não afetam somente o sistema reprodutivo, mas também influenciam o sistema imunológico.

Em humanos, os hormônios esteroides (androgênios e estrogênios) regulam o processo de desenvolvimento fetal, como a diferenciação sexual. Androgênios, incluindo a testosterona, regulam o desenvolvimento do fenótipo masculino e um distúrbio no nível de esteroide pode causar feminização de fetos masculinos, caso exista um excesso de compostos estrogênicos ou uma deficiência de androgênios. Por outro lado, fetos femininos podem se tornar masculinizados devido ao excesso de androgênio ou pela falta de estrogênio durante o período de diferenciação sexual do feto (WARING e HARRIS, 2005).

Mulheres que engravidam enquanto tomam anticoncepcionais, como o 17α -estradiol, podem gerar bebês com risco de desenvolvimento de doenças de próstata quando adultos. Existem outros problemas clínicos que podem ser causados por estrogênios durante a gravidez: má formação genital e infertilidade. Altos níveis de exposição prejudicam a gravidez, podendo levar ao aborto espontâneo, dependendo da espécie (DASTON *et al.*, 1997).

Investigações também vêm sendo realizadas em laboratórios e em campo para avaliar os efeitos de certos compostos químicos na função endócrina de outros animais mamíferos, invertebrados, peixes, répteis e pássaros (HARRISON *et al.*, 1997). Compostos naturais e sintéticos têm potencial para desregular a reprodução e o desenvolvimento desses animais. Esses compostos podem induzir irreversivelmente características sexuais femininas em peixes machos (GRAY Jr., 1998), podendo levar a esterilização ou redução da reprodução.

No ambiente aquático, a exposição de organismos a desreguladores endócrinos está relacionada a efeitos endócrinos em peixes machos como indução de vitelogenina e feminização dos órgãos

reprodutivos (SUMPTER, 1998; ROUTLEDGE *et al.*, 1998; PURDOM *et al.*, 1994). Vitelogenina é uma lipoproteína que, em circunstâncias normais, somente é detectável no plasma sanguíneo de peixes fêmeas adultos (NOGUEIRA, 2003).

Estudos realizados por Harrison *et al.* (1997) mostraram que, quando trutas (*Oncorhynchus mykiss*) foram mantidas em gaiolas perto de descargas de uma estação de tratamento de efluentes, foi observada a síntese de vitelogenina em machos. Níveis elevados de vitelogenina e diminuição do nível de testosterona foram verificados por Folmar *et al.* (2002) em carpas macho (*Cyprinus carpio*) que viviam próximas a regiões de descarte de efluentes. Aumento do nível de vitelogenina, feminização de machos e presença simultânea de gônadas masculinas e femininas (hermafrodita) foram observados em peixes (*Rutilus rutilus*) submetidos a efluentes de estações de tratamento de esgoto (JOBILING *et al.*, 1998).

Trabalhos encontrados na literatura mostram que uma concentração de $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ de 17α -estradiol induz a expressão da vitelogenina em peixes (PURDOM *et al.*, 1994), que a faixa de concentração de $0,1$ a 15 ng L^{-1} pode afetar a diferenciação sexual e que a faixa de concentração de 2 a 10 ng L^{-1} pode afetar negativamente a fecundidade. Uma longa exposição a uma concentração de 5 ng L^{-1} leva a uma redução significativa na fecundidade dos descendentes (NASH *et al.*, 2004). Dessa forma, a concentração de 17α -estradiol encontrada no meio ambiente (entre $0,5$ e 7 ng L^{-1} , BILA e DEZOTTI, 2003) representa uma significativa contribuição para a disfunção no sistema reprodutivo de peixes (FENT *et al.*, 2006).

Estudos *in vivo* mostraram que a exposição de peixes a concentrações de 1 a 10 ng L^{-1} de 17β -estradiol e $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ de 17α -estradiol provocaram feminização de algumas espécies de peixes (ROUTLEDGE *et al.*, 1998). As fêmeas do peixe *Japanese medaka* apresentaram menor fecundidade quando expostas a 17β -estradiol. Os estrogênios não induzem efeitos adversos somente em animais, mas também interferem no crescimento e desenvolvimento de plantas (LAI *et al.*, 2002).

A partir dos efeitos provocados pelos desreguladores endócrinos em animais e humanos e da ocorrência dessas substâncias em águas superficiais e subterrâneas, verifica-se a necessidade de estudos relativos a métodos de determinação e degradação dessas substâncias.

2.1.2 Estrogênios

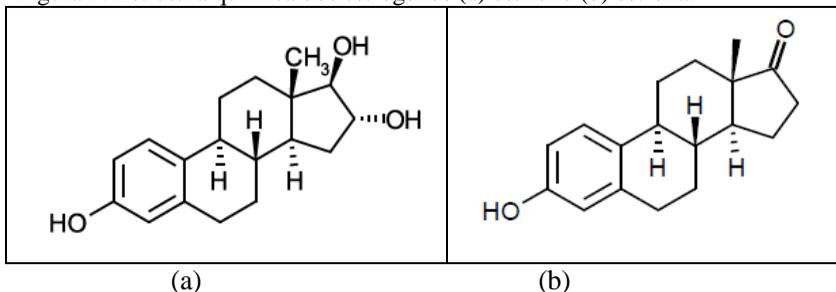
Os hormônios podem ser classificados de acordo com a sua natureza, sendo ela natural (produção natural do corpo humano) ou artificial (produção industrial). Os hormônios produzidos a partir do colesterol podem ainda ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos ou estrógenos, hormônios sexuais masculinos ou andrógenos, e hormônios de gravidez ou progestrôgenos (LARSEN, et al., 2003; REIS FILHO, et al., 2006).

Os hormônios esteroides compreendem os estrógenos e os progestrôgenos e são um grupo de compostos biologicamente ativos que são sintetizados a partir do colesterol. Têm em comum uma estrutura constituída de três anéis hexagonais e um anel pentagonal. Como são os principais responsáveis pelo crescimento e pela reprodução de espécies animais, incluindo os seres humanos, seus derivados sintéticos são bastante empregados como contraceptivos (hormônios inibidores do processo de ovulação).

Os estrogênios são caracterizados por seu anel fenólico, o qual tem um grupamento hidroxila responsável pela atividade biológica, ou seja, pela atividade estrogênica. As estruturas químicas dos estrogênios estrona (E1) e estriol (E3) são mostradas na Figura 1(a e b). São prioritariamente administrados no controle dos sintomas que envolvem a menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de próstata e de mama.

Os progestagênios apresentam substituição do grupo fenólico presente nos estrogênios por um grupo cetona. São empregados nos tratamentos voltados para as causas de infertilidade e descontrole do ciclo menstrual. Em geral, são rapidamente absorvidos pelo organismo e, então, metabolizados no fígado (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Figura 1: Estrutura química dos estrógenos (a) estriol e (b) estrona.



Os componentes estriol e estrona são hormônios sexuais femininos produzidos por humanos, por outros mamíferos e por alguns vertebrados. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores no organismo dos animais e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos desreguladores desencadeados pela disposição de efluentes (YING *et al.*, 2002; REIS FILHO *et al.*, 2006).

O uso cada vez maior de pílulas anticoncepcionais resulta em uma maior preocupação em relação aos problemas causados pelos desreguladores endócrinos, uma vez que concentrações muito baixas de 17α -estradiol têm provocado efeitos alarmantes no processo de reprodução e desenvolvimento de organismos.

Face ao destaque desses hormônios (estriol e estrona) em relação aos demais, tanto no tocante a intensa atividade estrogênica quanto à quantidade majoritária no ambiente, além da falta de metodologias descritas na literatura, propõe-se, neste trabalho, metodologia de determinação e quantificação baseada em métodos eletroanalíticos.

2.1.3 Propriedades Físicas e Químicas dos Hormônios Estudados

O estriol, com massa molar de $288,37 \text{ g mol}^{-1}$, é uma das formas de estrógeno metabolizado do 17β -estradiol por meio da estrona advinda do ovário das mulheres, com fraco efeito estrogênico. É o principal esteroide estrogênico produzido durante a gravidez. Sua concentração no plasma e urina aumenta constantemente durante esse período. O estriol livre passa da placenta para a circulação onde é rapidamente convertido em derivados facilitando sua excreção. Por esta razão, esse hormônio possui uma vida média curta de somente 20 minutos no sangue materno (HUMAN DO BRASIL, 2010).

O estriol é usado, geralmente, para o tratamento dos sintomas da menopausa como uma alternativa ao 17 β -estradiol, estrona ou uma combinação dos dois (KUMAR *et al.*, 2009a).

A estrona é formada primeiramente no organismo animal juntamente com o 17 β -estradiol; sua massa molar é 270,37 g mol⁻¹.

A função da estrona no organismo humano ainda não é bem definida, porém, sua determinação, em mulheres, ajuda na avaliação do sangue vaginal pós-menopausa e, em homens, é importante na avaliação de ginecomastia ou detecção de tumores produtores de estrona. É um componente estrogênico primário de várias fórmulas farmacêuticas, incluindo aquelas contendo estrógenos conjugados e esterificados.

Na Tabela 1 são apresentadas algumas propriedades físicas e químicas dos estrogênios naturais (estrona e estriol).

Tabela 1: Propriedades físicas e químicas relevantes dos esteroides avaliados

Hormônio	Sigla	log K _{ow} *	Pressão de vapor (mmHg)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹ a 20 °C)	pKa
Estriol	E3	2,81	6,7 x 10 ⁻¹⁵	13	10,4
Estrona	E1	3,13	2,3 x 10 ⁻¹⁰	12	10,5

* Coeficiente de partição octanol-água Fonte: Ghiselli e Jardim (2006).

A partir destas propriedades, K_{ow} (coeficiente de partição octanol-água), a pressão de vapor e a solubilidade em água, observa-se que esses estrogênios são compostos orgânicos hidrofóbicos, de baixa volatilidade e pouco solúveis em água. Em organismos vivos, encontram-se em maior concentração no tecido adiposo dos animais (SOLÉ *et al.*, 2003) e no ambiente, encontram-se adsorvidas aos sedimentos.

Portanto, é de se esperar que a adsorção no solo, ou sedimento ou lodo biológico seja um significativo fator da redução da concentração desses estrogênios na fase aquosa (LAI *et al.*, 2000; LARSEN, 2003; URASE e KIKUTA, 2005).

Provavelmente, durante o tratamento biológico, parte desses estrogênios fica retida no lodo biológico (na camada lipídica das células), devido à sua hidrofobicidade, podendo ocorrer, conseqüentemente, bioacumulação (JOHNSON e SUMPTER, 2001; OLEA *et al.*, 2002; ANDERSEN *et al.*, 2005). Andersen *et al.* (2003) verificaram que não existe um equilíbrio entre os níveis de hormônios na fase líquida e na fase sólida (no lodo).

Estudos indicam a probabilidade da degradação demorar apenas alguns dias se as circunstâncias forem ótimas ou poderá ser bastante lenta em condições desfavoráveis (BELFROID *et al.*, 1999).

Por serem solúveis em gordura, altos níveis podem estar presentes em carne, peixe, ovos e derivados do leite. Hartmann *et al.* (1998) relataram a ocorrência de hormônios sexuais (17 β -E2, estrona, testosterona e progesterona) em carnes (gado, porco, aves, peixe), leite e seus derivados, ovos e plantas (gramíneas e leguminosas). A contaminação de alimentos também pode vir do fato de que alguns hormônios são aplicados na criação de animais e, conseqüentemente, consumidos na alimentação humana (PICKERING e SUMPTER, 2003).

Estudos demonstraram que o esterco animal afeta a qualidade das águas superficiais e de subsolo. Peterson *et al.* (2000) relataram a presença de 17 β -estradiol e estrona (6 a 66 ng L⁻¹) em águas subterrâneas próximas a áreas com alta densidade de criação de animais. Os estrogênios são naturalmente excretados pelos animais ou são administrados nos mesmos como promotores de crescimento, mesmo esta prática não sendo mais permitida em muitos países.

A produção de estrogênios por homens e mulheres varia em função de fatores como gênero, idade e ciclo reprodutivo. Mulheres produzem e excretam mais estrogênios do que os homens e a produção é mais abundante durante a fase fértil do que no período pós-menopausa. A maioria dos estrogênios naturais tem vida curta e não acumulam nos tecidos. Por outro lado, estrogênios sintéticos como 17 α -estradiol e dietilstilbestrol (DES) são mais estáveis e permanecem no corpo mais tempo do que os estrogênios naturais (TAPIERO *et al.*, 2002).

Baseado em pesquisas e medições prévias da excreção de estrogênios por humanos, Johnson *et al.* (2000) estimaram a excreção diária de estrogênios por homens e mulheres, cujos valores são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Excreção diária (μ g) de esteróides estrogênicos em humanos.

Categoria	estriol	estrona
Homens	1,5	3,9
Mulheres menstruadas	4,8	8,0
Mulheres na menopausa	1	4,0
Mulheres grávidas	6000	600

Fonte: Adaptado de Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000)

Os estrogênios são excretados pelo corpo principalmente como formas biológicas inativas conjugadas (sulfatos e glucuronides). Os

estrogênios conjugados não possuem atividade biológica direta, porém, uma grande proporção presente no esgoto é provavelmente desconjugada pelas bactérias fecais (*Escherichia coli*) antes de alcançar as estações de tratamento de esgotos (BARONTI *et al.*, 2000; D'ASCENZO *et al.*, 2003; COLEMAN *et al.*, 2004). Os estrogênios conjugados na forma de glucuronídeos são muito menos recalcitrantes à degradação biológica do que os estrogênios sulfatados (D'ASCENZO *et al.*, 2003).

Baseado na excreção diária de estrógenos por humanos, o fator de diluição e prévias medições, espera-se encontrar estrógenos na concentração de ng L^{-1} em amostras ambientais de água de rio (JOHNSON *et al.*, 2000).

2.1.4 Métodos para Determinação de Hormônios

Há uma variedade de métodos disponíveis para a determinação dos desreguladores endócrinos. Dentre as análises químicas, destacam-se os métodos de cromatografia gasosa e líquida associadas à espectrometria de massas.

A determinação de hormônios no ambiente constitui-se em tarefa difícil, devido à complexidade das matrizes ambientais e a sua baixa concentração, porém fisiologicamente ativa (REIS FILHO *et al.*, 2006).

Os métodos descritos na literatura para detecção de desreguladores em ambiente aquático na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} são baseados na extração, em alguns casos derivatização do hidrogênio ácido e determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/EM/EM) ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/EM/EM) (BROSSA *et al.*, 2002; HERNANDO *et al.*, 2004). A cromatografia líquida vem sendo amplamente empregada na determinação de esteroides estrogênicos por não ser necessária a derivatização das substâncias.

A técnica de pré-concentração é geralmente necessária para a determinação desses compostos. Existem diferentes técnicas para a extração de contaminantes presentes em amostras ambientais: extração líquido - líquido, destilação a vapor, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, ultra-sonificação, extração com fluido supercrítico, entre outras (JEANNOT *et al.*, 2002). Dentre essas técnicas, a extração em fase sólida é a mais comumente empregada (BROSSA *et al.*, 2002).

A aceitação cada vez mais abrangente da extração em fase sólida (EFS) reside no fato de que esta técnica permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e pré-purificação (BELFROID *et al.*, 1999; BARONTI *et al.*, 2000; JOHNSON *et al.*, 2000; JOHNSON E SUMPTER, 2001; CARGOUËT *et al.*, 2004; LAGANÀ *et al.*, 2004; SERVOS *et al.*, 2005).

A alta massa molar e a presença de grupos polares nas moléculas de compostos esteroides são propriedades que tornam a análise direta por cromatografia gasosa dessas substâncias bastante difícil, uma vez que essas moléculas não são estáveis sob condições de cromatografia gasosa. Portanto, muitas substâncias comumente sofrem derivatização antes da análise por cromatografia gasosa, com o objetivo de facilitar a determinação destas. A cromatografia gasosa é limitada ao uso para compostos que são voláteis. Dessa forma, por meio da derivatização, é possível superar a limitação da volatilidade e estabilidade (SERVOS *et al.*, 2005).

É possível encontrar centenas de artigos científicos utilizando métodos cromatográficos para determinação de compostos estrógenos. Uma boa revisão desses métodos analíticos foi realizada por Gabet *et al.* (2007). Neste trabalho, serão expostos os principais trabalhos publicados nos últimos cinco anos apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Revisão dos últimos 5 anos sobre trabalhos de determinação dos estrogênios estriol e estrona.*

SUBSTÂNCIA	TÉCNICA ANALÍTICA	FAIXA LINEAR	LIMITE DE DETECÇÃO	AMOSTRAS ANALISADAS	REFERÊNCIA
estrona e seu conjugado e estriol.	LC/MS/MS	0,001 – 0,1 ng L ⁻¹	0,002 ng L ⁻¹ estriol, 0,001 ng L ⁻¹ estrona e seu conjugado	águas residuárias	Koh <i>et al.</i> (2007)
estriol e estrona e alguns subprodutos estrona	LC/MS/MS LC-ESI-MS	estriol 1,0 – 20 ng g ⁻¹ estrona 1,0 – 20 ng g ⁻¹	estriol 0,77 ng g ⁻¹ estrona 0,75 ng g ⁻¹ estrona 1 pg mL ⁻¹	sedimento de rios soro de sangue humano	Matejicek <i>et al.</i> (2007) Yamashita <i>et al.</i> (2007)
23 esteróides, incluindo, estrona e estriol	LC/MS/MS	0,003 – 1 ng L ⁻¹	0,001 ng L ⁻¹ estriol 0,003 ng L ⁻¹ estrona	urina de macaco	Hauser <i>et al.</i> (2008)
estriol e estrona ente outros estrogênios	LC-EI/MS	0,2 a 20 ng L ⁻¹ , exceto para o estriol, que variou de 1 a 20 ng L ⁻¹	estriol 285 pg L ⁻¹ estrona 70 pg L ⁻¹	água de rio	Matejicek e Kuban (2008)
estrona, estriol e suas respectivas formas conjugadas	LC-MS-MS	estriol 3 – 1000 µg L ⁻¹ estrona 0,75 -250 µg L ⁻¹	estriol 26 µg kg ⁻¹ estrona 11 µg kg ⁻¹	lodo de esgoto proveniente de estação de tratamento	Nieto <i>et al.</i> (2008)
estriol e estrona	LC-APPI-MS/MS		50 ng L ⁻¹ estriol 10 µg L ⁻¹ estrona	água de superfície e em esgoto bruto	Viglino <i>et al.</i> (2008)
estriol, 17β-estradiol e estrona	LC/UV	0,05 - 400 µg L ⁻¹ estriol 0,1 - 400 µg L ⁻¹ estrona	5,6 ng L ⁻¹ estriol 16,2 ng L ⁻¹ estrona	água de superfície pré tratamento	Wang <i>et al.</i> (2008)

estrona e estriol além das formas conjugadas à sulfato e glucuronídeos desses esteróides	LC/MS		0,3 ng L ⁻¹ para a estrona 0,5 ng L ⁻¹ para o estriol	esgoto bruto e tratado e em água de rio	Kumar <i>et al.</i> (2009)
15 esteróides, entre eles, estrona	GC/MS	0,026–0,13 ng L ⁻¹	0,001 ng L ⁻¹	sangue de rato	Chen <i>et al.</i> (2009b)
estrona, estriol e dois estrógenos sintéticos	LC/ESI LC/APPI	ESI estriol e estrona 10-1000 µg L ⁻¹ Outros 25-1000 µg L ⁻¹ APPI estriol e estrona 20-1000 µg L ⁻¹ , Outros 10-1000 µg L ⁻¹	ESI estriol e estrona 8 ng L ⁻¹ outros 15 ng L ⁻¹ APPI estriol e estrona 12 ng L ⁻¹ , outros 6 ng L ⁻¹	afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgotos	Chen <i>et al.</i> (2009a)
estrona e 17β-estradiol	GC/MS/MS GC/MS LC/MS/MS	CG/MS/MS e CG/MS 1 a 500 ng L ⁻¹	CG/MS/MS e CG/MS 0,3 e 0,7 ng L ⁻¹	efluentes de estação de tratamento	Grover <i>et al.</i> (2009)
estrona, 17β-estradiol e estriol	LC/MS/MS	CL/MS/MS 15 a 750 ng L ⁻¹ 1,0 a 200 ng L ⁻¹	CL/MS/MS 0,6 ng L ⁻¹ estrona - 0,25 µg L ⁻¹ estriol - 0,5 µg L ⁻¹	efluentes de estação de tratamento de esgotos	Miege <i>et al.</i> (2009)
estrona, 17β-estradiol e estriol entre outros desreguladores endócrinos	GC/MS	estrona 2,5-500 ng L ⁻¹ estriol 5 a 750 ng L ⁻¹	estrona 1,2 µg L ⁻¹ estriol 2,3 µg L ⁻¹	lodo de esgotos proveniente de estação de tratamento	Nie <i>et al.</i> (2009)

11 estrógenos nas formas livre e conjugada	LC-(ESI)MS-MS	0,75–250 $\mu\text{g L}^{-1}$ estrona; 3–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ estriol;	15 ng L^{-1} estrona 30 ng L^{-1} para as demais substâncias analisadas	não houve aplicação do método	Pedrouzo <i>et al.</i> (2009)
estrona, 17β-estradiol e estriol	LC/MS	0,003 a 0,15 ng L^{-1}	0,003 ng L^{-1} estriol 0,0008 ng L^{-1} estrona	leite	Yan <i>et al.</i> (2009)
estrona, entre outros 9 fármacos e mais dois hormônios	GC/MS	0,15–400 ng L^{-1}	0,05 ng L^{-1}	água de torneira, poço, rio, lago, piscina e águas residuárias	Azzouz <i>et al.</i> (2010)
estrona, 17β-estradiol e estriol	LC/UV	estrona 5-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ estriol 10 – 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	estrona 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ estriol 2,7 $\mu\text{g L}^{-1}$.	água de rio e de torneira	Chang e Huang (2010)
estrona entre outros	GC-MS/MS	0,7–2,5 ng mL^{-1}	estrona 0,7 ng mL^{-1}	amostra de bile de peixe	Fenlon <i>et al.</i> (2010)
estrona e 17β-estradiol	CL-MS/MS	0,0005 a 0,05 pg L^{-1}	0,1892 pg L^{-1} estrona	plasma humana	Hosogi <i>et al.</i> (2010)
estrona, 17β-estradiol e estriol	SPME-CL/UV	estriol 5,0–30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ estrona 15,0–40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	estriol 1,28 $\mu\text{g L}^{-1}$ estrona 2,39 $\mu\text{g L}^{-1}$	tecidos de peixes e camarão	Hu <i>et al.</i> (2010)
estradiol e estrona e seus metabólitos	LC- (ESI)-MS LC- ECAPCI/MRM/MS	0,005 a 2 pg L^{-1}	0,74 pg L^{-1}	tumores de próstata e mama	Penning <i>et al.</i> (2010)
estrógenos, entre eles, estrona e estriol	CL-MS	0,1 ng L^{-1} a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,1 ng L^{-1} estrona 0,2 ng L^{-1} estriol	amostras de água do rio Atibaia - SP	Sodré <i>et al.</i> (2010)
estrona , 17β-Estradiol estriol e seus metabólitos	LC-ESI-MS/MS		6 ng L^{-1}	efluentes de ETE	Vega-Morales <i>et al.</i> (2010)
estrona e 17α-estradiol	GC/MS-NCI	1,25 - 250 ng g^{-1}	estrona – 0,68 ng g^{-1}	tecido de peixe	Al-Ansari <i>et al.</i> (2011)

20 compostos farmacêuticos, entre eles, estrona	GC/MS	estrona 7,9–10.000 ng kg ⁻¹	estrona 2,4 ng kg ⁻¹	amostras de tecido animal	Azzouz et al. (2011)
estrona, estriol, 17β-estradiol e 17α-estradiol	CL/ MS–MS	estrona 17,3 - 500 ng L ⁻¹ estriol 7,3 - 500 ng L ⁻¹	estrona 4,7 ng L ⁻¹ estriol 3,9 ng L ⁻¹	água de rio	Kozlík et al. (2011)
estrona, estriol entre outros hormônios	UHPLC/ MIP	50 – 500 ng L ⁻¹	32,6 ng L ⁻¹	água de rio e de torneira	Lucci et al. (2011)
estrona, estriol, 17β-estradiol e 17α-estradiol	ESI-MS/MS	0,02 a 0,3 pg L ⁻¹	estrona – 0,019 pg L ⁻¹ estriol – 0,035 pg L ⁻¹	fluido cerebrospinal humano	Nguyen et al. (2011)
estrona, estriol e mais 16 esteróides	LC/MS/MS	1,0 a 400 ng L ⁻¹	estriol - 5,2 ng L ⁻¹ estrona - 1,0 ng L ⁻¹	água de torneira e rio	Wang et al. (2011)
10 hormônios, entre eles: estrona	UV/ HPLC	estrona 0,2281–2,9200 ng L ⁻¹	estrona 0,2413 ng L ⁻¹	água de lagos e de chuva	Zhang et al. (2011a)
estrona, 17α-estradiol e 17β-estradiol e estriol	SPLE/ GC–MS	estrona 0,1 a 120 ng g ⁻¹ estriol 0,2 a 120 ng g ⁻¹	0,02 ng g ⁻¹	amostras de solo	Zhang et al. (2011b)
27 desreguladores endócrinos, entre eles: estrona e estriol	SPE-LC–MS/MS	estrona e estriol 20–1000 ng L ⁻¹	estrona e estriol 1,3 ng L ⁻¹	amostras de esgoto	Vega-Morales et al. (2012)
36 desreguladores endócrinos, entre eles: estrona e estriol	LC-Q-TOF-MS	0,9-500 ng.L ⁻¹	estriol - 0,28 ng L ⁻¹ estrona 0,31 ng L ⁻¹	água potável e de rio	Wang et al. (2012a)
14 fármacos, entre eles, estrona	GC–MS	10,0–2000 pg g ⁻¹	4,0 pg g ⁻¹	lodo de esgoto	Yu e Wu (2012)
4 hormônios, entre eles, estrona	HPLC/ SWCNT	3,0–90,0 μg L ⁻¹	estrona - 0,34 μg L ⁻¹	água de torneira e água do mar	Ma et al (2012)

5 hormônios, entre eles, estrona	HPLC/ capilar monolítico	0,50–15,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	estrona – 0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$	urina e leite	Hu et al. (2012)
estrona , estriol e mais 17 esteróides	LC–MS/MS	estrona 0,044 a 0,1913 ng L^{-1} estriol 0,0001 a 0,097 ng L^{-1}	estrona 0,0147 ng L^{-1} estriol 0,0032 ng L^{-1}	fezes de macaco	Weltring et al. (2012)
17β-Estradiol, estriol e estrona	LC/ NCs	estriol 2,0 a 8,0 ng L^{-1} estrona 4,8 a 8,3 ng L^{-1}	estriol 4,3 ng L^{-1} estrona 1,4 ng L^{-1}	água de torneira	Wang et al. (2012b)
27 poluentes emergentes, entre eles, estrona	HPLC–MS/MS	0,4 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	450 ng L^{-1}	água de rio	Camilleri et al. (2012)
22 fármacos, incluindo, estrona	GC–MS	2,8 a 15,000 ng L^{-1}	estrona - 0,8 ng L^{-1}	sangue e urina	Azzouz e Ballesteros (2012)
estrona e 17β-Estradiol	LC–MS/MS	0,0019 a 2,000 pg L^{-1}	0,0019 pg L^{-1}	sangue humano	Fiers et al. (2012)
8 desreguladores endócrinos, entre eles: estrona e estriol	HPLC/UV	2,0 a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,0 ng L^{-1}	amostras de esgoto	Zhang et al. (2012)
17β-estradiol e estrona	UVCPE-HPLC/DAD	0,005 a 1 ng L^{-1}	0,0001 ng L^{-1}	urina humana	Zou et al. (2012)

*Tabela adaptada com faixa linear e LD que relacionam massa e volume ou massa e massa a fim de facilitar a interpretação destes valores.

Percebe-se que a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS-MS) tem boa sensibilidade, e é o método mais utilizado. Porém, esta técnica exige, normalmente, que a amostra sofra pré tratamento, como a extração líquido-líquido ou a extração em fase sólida anteriormente citada.

Portanto, o desenvolvimento de técnicas menos trabalhosas no sentido da diminuição da quantidade de etapas do processo se faz emergente. Por apresentar essas características, além da alta seletividade e sensibilidade, os métodos eletroanalíticos se mostram como opção viável.

2.1.5 Determinações Eletroanalíticas dos Estrogênios Estrona e Estriol

Pouco pode ser encontrado na literatura a respeito de métodos eletroanalíticos para determinação de estrógenos. A seguir, serão apresentados artigos publicados até dezembro de 2012.

Um ensaio sensível e rápido de varredura polarográfica foi desenvolvido para a determinação de estradiol e estriol. O ensaio envolve a nitração controlada usando $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de solução de nitrito de sódio a 100°C em banho-maria durante 30 min. O estradiol e estrona nitrados foram determinados diretamente na mistura de reação por polarografia. Devido à capacidade de forte adsorção de derivados nitro, a sensibilidade do método polarográfico é elevada. Os limites de detecção foram 6×10^{-8} e $4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O procedimento foi aplicado para a determinação do estriol em urina de mulheres grávidas (HU *et al.*, 2002).

Yang *et al.* (2009) modificaram a superfície de eletrodos de carbono vítreo utilizando nanotubos de carbono dispostos em múltiplas camadas para determinação de estrona. A faixa linear de trabalho variou de $5,0 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e o limite de detecção foi de $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. O potencial de pico da oxidação da estrona foi verificado em 0,58 V, potencial muito próximo do encontrado por Jin e Lin (2005). O método foi aplicado na determinação de estrona em formulações farmacêuticas comerciais.

Jin e Lin (2005), por sua vez, utilizaram eletrodo de grafite modificado com carbamilcolina aderida em parafina para determinação simultânea de 17β -estradiol, estrona e estriol. Os três picos de oxidação foram encontrados em potencial de 0,55V/SCE. Portanto, a concentração encontrada foi denominada estrógenos totais e as concentrações individuais destes hormônios foram estimadas a partir da

relação típica de 17 β -estradiol:estrona:estriol como sendo 2:2:1 e as faixas lineares foram de 4×10^{-6} a 4×10^{-5} , de 3×10^{-7} a 3×10^{-5} e 5×10^{-7} a 9×10^{-6} mol L⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado satisfatoriamente em soro sanguíneo de mulheres gestantes.

Um ano depois, Lin e Li (2006) utilizaram aglomerados de platina associados a multicamadas de nanotubos de carbono na modificação de eletrodos de carbono vítreo. O método foi desenvolvido para determinação de estrona, 17 β -estradiol e estriol e aplicado na determinação destes em soro sanguíneo humano. A faixa linear apresentada pela determinação voltamétrica através de voltametria de onda quadrada foi $5,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para 17 β -estradiol, $2,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para estrona, e $1,0 \times 10^{-6} - 7,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para estriol. O potencial de pico de oxidação dos três estrógenos foi em 0,43V/SCE, e a determinação realizada foi de estrógenos totais, apenas estimando-se, portanto, as concentrações individuais destes estrógenos, como citado no trabalho anterior. Os limites de detecção foram de 840 nmol L⁻¹ para estrona, 620 nmol L⁻¹ para estriol e 180 nmol L⁻¹ para 17 β -estradiol.

2.2 DIAMANTE DOPADO COM BORO

Eletrodos de diamante dopado com boro (EDDB) têm sido intensamente estudados nos últimos anos, em relação as suas propriedades eletroquímicas fundamentais e também em termos de suas aplicações eletroanalíticas.

Eletrodos EDDB têm alta estabilidade e dureza, apresentam superfície inerte e baixa corrente capacitiva. Assim, têm sido amplamente utilizados em eletropolimerização, eletroanalítica, combustão eletroquímica, e como eletrocatalisadores. A seguir, serão discutidas essas e outras propriedades e apresentados alguns trabalhos de aplicação de eletrodos EDDB em eletroanalítica.

O diamante é uma forma alotrópica rara do carbono. Apresenta arranjo tetraédrico, no qual os átomos de carbono se ligam covalentemente formando uma estrutura cristalina extremamente rígida. Entre outros fatores, a hibridização do carbono (sp³) confere propriedades bastante peculiares a essa estrutura, como: inércia química, extrema dureza e baixa condutividade térmica. Ainda, e mais importante, o diamante apresenta alta resistividade elétrica (10^{16} Ω cm⁻¹ com *band gap* – 5,47 eV a 300 K) o que impossibilita sua utilização como eletrodo, porém ao se utilizar o boro como elemento dopante,

tem-se um material de excelente qualidade para utilização em eletroanalítica.

A dopagem com boro consiste em substituir alguns átomos de carbono na estrutura cristalina do diamante por átomos de boro, para garantir a condutividade elétrica (LUONG *et al.*, 2009).

A escolha do elemento boro se dá comumente por apresentar uma energia de ativação na transferência de carga favorável (0,37 eV), formando, assim, um semicondutor do tipo p. Outros elementos também são utilizados como dopantes do diamante, são eles: nitrogênio, fósforo e enxofre, nesse caso, são formados semicondutores tipo n.¹

Geralmente a fonte de boro é proveniente do gás trimetil-boro, numa concentração que varia entre 10 e 20000 ppm (ZHANG *et al.*, 1996).

A síntese de diamante foi realizada em laboratório pela primeira vez em 1905 por Burton, mas foi somente em 1963 que o boro, através do crescimento a alta pressão e temperatura, foi incorporado ao diamante para produzir um material semicondutor, dando início aos estudos de aperfeiçoamento do chamado eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês: *Boron-doped Diamond* – BDD) (BUNDY, 1963; MATSUMOTO *et al.*, 1982).

Em 1982, no Instituto Nacional de Pesquisa em Materiais Inorgânicos (Japão), foi desenvolvida uma nova técnica para produzir filmes de diamante, de boa qualidade, sobre substratos que não sejam o diamante a partir de misturas de hidrogênio e hidrocarbonetos (MATSUMOTO *et al.*, 1982).

Este procedimento foi descrito como a deposição química a partir da fase vapor assistida por filamento quente (HFCVD, sigla do inglês: *Hot Filament-Chemical Vapor Deposition*). Um ano mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa reportou outro método denominado deposição química, a partir da fase vapor assistida por descarga de

¹ Quando um átomo de B ($2s^2 2p^1$) substitui um átomo de C ($2s^2 2p^2$), uma das ligações C-B é deficiente em um elétron. Sob a influência de uma voltagem aplicada, um elétron de um átomo vizinho pode mover-se para preencher esta deficiência, deixando, assim, uma vacância positiva atrás de si. Quando esta vacância é preenchida, outra é criada em outro lugar e a condução elétrica resulta da migração destas vacâncias positivas através do cristal. Em virtude da natureza positiva da carga transportada, a substância é considerada um semicondutor tipo p.

O fósforo ($3s^2 3p^3$), por exemplo, tem um elétron a mais que o carbono em sua camada de valência. Quando o fósforo é adicionado ao carbono, os elétrons extras fornecidos são capazes de se mover através do sólido, quando aplicada uma voltagem. Em virtude da condução ser devido a elétrons, o cristal é chamado semicondutor tipo n.

microondas (MWCVD ou CVD, sigla do inglês: *MicroWave Chemical Vapor Deposition*) (KAMO *et al.*, 1983).

A técnica CVD vem sofrendo constante aprimoramento com o estudo de novas fases vapor e a implementação de novos reatores, sendo hoje utilizada para a confecção de filmes ultrafinos de diamante dopado com boro (EDDB) em diferentes substratos.

A concentração do boro determina a resistência específica de um filme de EDDB. Concentrações de 10^{18} átomos cm^{-3} determinam uma resistência na ordem de $10^4 \Omega$, enquanto concentrações de 10^{21} átomos cm^{-3} conduzem a uma resistência na ordem de $10^{-2} \Omega$ (VARNIN, 1990; LUONG *et al.*, 2009).

A fonte de carbono pode ser o metano, o metanol, a acetona ou qualquer composto orgânico preferencialmente volátil. Usualmente escolhe-se o metano por ser um composto abundante e que preenche todos os requisitos para uma boa deposição pela técnica de CVD. O substrato a ser escolhido para a confecção do eletrodo de EDDB é outro fator importante. O melhor substrato é aquele que possui boa resistência mecânica e coeficiente de dilatação parecido com o do filme de diamante, para não ocorrerem eventuais rachaduras após a retirada do eletrodo do reator (SLACK, 1975). Comumente utiliza-se silício como substrato.

Em contrapartida, estudo realizado por Fisher *et al.* (1998) mostrou que a evolução da técnica de CVD tornou possível construir eletrodos de EDDB sobre os mais diferentes substratos, e ainda se observa tendência de queda de preço devido ao aprimoramento das tecnologias utilizadas, tornando viável, inclusive, o uso de eletrodos de EDDB para degradação de diversos compostos em esgotos domésticos e industriais.

O eletrodo EDDB possui propriedades significativamente diferentes das formas alotrópicas de carbono comumente utilizadas em eletroquímica, como os eletrodos de grafite pirolítico e de carbono vítreo. Possui uma grande janela eletroquímica entre as reações de desprendimento de hidrogênio e oxigênio em meio aquoso (BACHMANN *et al.*, 1989), ou não-aquoso (WU *et al.*, 1998), elevada estabilidade química e mecânica e alta resistência contra a corrosão (SWAIN, 1994).

Em contraste também com a maioria das superfícies de carbono que possuem hibridização sp^2 , o diamante dopado com boro não apresenta reações que desencadeiam adsorção de óxidos na superfície do eletrodo (LUONG *et al.*, 2009).

As baixas correntes capacitivas observadas na polarização do eletrodo EDDB por Vinokur *et al.* (1996) também auxiliam a classificar esse eletrodo como excelente ferramenta eletroanalítica.

2.2.1 Aplicações do Eletrodo de Diamante Dopado com Boro na Eletroanalítica

Com o aparecimento do eletrodo EDDB surgiram publicações nas mais diversas áreas da eletroquímica e eletroanalítica, evidenciando o interesse de pesquisadores por esta ferramenta. Alguns artigos de revisão, como os elaborados por Tenne e Lévy-Clément (1998), Rao e Fujishima (2000), Pleskov (2002), e por Luong *et al.*, (2009) fornecem um bom histórico das pesquisas realizadas. Percebe-se a versatilidade deste tipo de eletrodo na determinação de íons inorgânicos, metais e moléculas orgânicas, por oxidação ou redução e ainda apresentando baixos limites de detecção, em alguns casos, chegando a concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$.

Entretanto, o comportamento eletroquímico dos eletrodos EDDB, observado em diferentes experiências de laboratório e em diversos laboratórios não pode ser satisfatoriamente comparado porque depende das propriedades físicas, químicas e eletrônicas do material. Estas propriedades são geralmente afetadas pela quantidade e tipo de dopante, fatores morfológicos e defeitos no filme, presença de impurezas (carbono sp^2) e terminação da superfície (hidrogênio, oxigênio). Esta terminação superficial pode ser gerada usando tratamentos eletroquímicos (redução da água ou solução ácida para produzir terminações hidrogênio e oxidação da água para produzir terminações oxigênio) ou, ainda, por tratamentos utilizando plasma (GOETING *et al.*, 2000; FERRO *et al.*, 2002; LUONG *et al.*, 2009).

A velocidade de transferência de carga de alguns pares redox pode mudar com a terminação da superfície do eletrodo EDDB. Neste sentido, Granger e Swain (1999) estudaram a influência das terminações superficiais do EDDB (obtidas por tratamentos por plasma) na reversibilidade do ferro/ferricianeto e de outros pares redox. Estes autores observaram que a reação do par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ procede mediante interações específicas na superfície do diamante com terminações hidrogênio e que estas interações superficiais são bloqueadas quando a superfície do EDDB contém terminações oxigênio *feito de bloqueio de sítios* produzidos por espécies carbono-oxigênio. Acredita-se que a terminação hidrogênio confere à superfície caráter

hidrofóbico, enquanto superfícies com terminação oxigênio apresentam-se hidrofílicas (LUONG *et al.*, 2009).

Suffredini *et al.* (2004) estudaram o comportamento do eletrodo de diamante após este ser submetido a um pré tratamento catódico da superfície, observando-se um comportamento reversível quase ideal para a reação de oxidação do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, além de melhorar sistematicamente todas as respostas eletroquímicas em meio aquoso.

Posteriormente, Mahe *et al.* (2005) também utilizaram as polarizações catódica e anódica para estudar a reatividade eletroquímica do par reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ sobre eletrodos EDDB. Estes autores observaram que o pré-tratamento catódico incrementa a reprodutibilidade e o valor da constante de velocidade de transferência de carga, quando comparado a trabalhos prévios publicados para este sistema eletroquímico sobre eletrodos EDDB recém preparados ou com as suas superfícies oxidadas. Este fato é consistente com a participação do hidrogênio dentro do processo de geração de vacâncias (*holes*) na superfície do EDDB.

A condutividade superficial do diamante com terminações hidrogênio é próximo de 10^{-5} - 10^{-4} S cm^{-1} a temperatura ambiente (MAIER *et al.*, 2000), enquanto o diamante com terminações oxigênio apresenta condutividade de aproximadamente 10^{-14} S cm^{-1} (ROSSI *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos, foram desenvolvidos utilizando esse pré tratamento na detecção de moléculas orgânicas em amostras reais utilizando-se a técnica de voltametria de onda quadrada. Os resultados mostraram-se satisfatórios e desta forma o pré-tratamento catódico tornar-se-á padrão em todos os estudos realizados neste trabalho. A seguir serão apresentados os mais significativos nos últimos cinco anos.

Medeiros *et al.* (2008) determinaram simultaneamente aspartame e ciclamato em produtos dietéticos. O limite de detecção do aspartame foi de $4,7 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} e o limite de detecção de ciclamato foi de $4,2 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . O eletrodo EDDB utilizado apresentava nível de dopagem de boro de 8.000 ppm.

Souza *et al.* (2008) quantificaram sulfadiazina e sulfametoxazol utilizando eletrodo de diamante com dopagem de boro de 8.000 ppm. As faixas lineares foram obtidas nos níveis de concentração de $8,01 \times 10^{-6}$ a $1,19 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} para sulfadiazina e $6,10 \times 10^{-6}$ a $6,01 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} para sulfametoxazol, com respectivos limites de detecção de $2,19 \times 10^{-6}$ e $1,15 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . O método desenvolvido foi aplicado na determinação destes em produtos farmacêuticos.

Lourenção *et al.* (2009) determinaram simultaneamente paracetamol e cafeína, em formulações farmacêuticas utilizando metodologia desenvolvida a partir de um eletrodo EDDB com nível de dopagem de 8.000 ppm. A faixa linear variou de $5,0 \times 10^{-7}$ a $8,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ambos os compostos e os limites de detecção foram $4,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $3,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o paracetamol e a cafeína, respectivamente.

Lima-Neto *et al.* (2010) desenvolveram metodologias utilizando dois eletrodos de diamante dopado com diferentes níveis de dopagem de boro (10.000 e 20.000 ppm). O limite de detecção para os eletrodos dopados com 10.000 e 20.000 ppm de boro foram $2,69 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $8,15 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, respectivamente. As metodologias foram aplicadas na determinação de nitrofurantoína em formulação comercial de produtos farmacêuticos.

Yardımlı *et al.* (2011) utilizaram EDDB para desenvolver metodologia de quantificação de benzo[a]pireno (BaP) através da técnica de onda quadrada. A faixa linear variou de concentrações de 4,04 - 50,46 ng mL⁻¹, com um limite de detecção de 0,72 ng mL⁻¹. Este método foi também aplicado para determinar BaP em amostra certificada de água.

Carbendazim (CBZ) e fenamifós (FNP) foram quantificados em água natural através de metodologia desenvolvida por França *et al.* (2012) utilizando voltametria de onda quadrada. A curva de calibração para a detecção de carbendazim apresentou boa linearidade na faixa de concentração de 0,50 - 15,0 µmol L⁻¹. A oxidação de fenamifós no eletrodo EDDB mostrou faixa de concentração de 0,5 a 25,0 µmol L⁻¹.

Um eletrodo de diamante dopado com boro (5.000) foi utilizado para detecção da demanda química de oxigênio (DQO), por meio de técnica amperométrica. O limite de detecção de DQO foi de 0,3 mg L⁻¹. E a faixa linear 0,35 a 1458,7 mg L⁻¹ (BOGDANOWICZ *et al.*, 2012).

Wang *et al.* (2012) também desenvolveram metodologia para determinação de DQO utilizando EDDB. A faixa linear foi de 0 - 23200 mg L⁻¹ e o limite de detecção de 0,192 mg L⁻¹.

Neste estudo, um eletrodo de diamante dopado com boro (10.000 ppm) foi utilizado para a determinação eletroanalítica de melatonina em formulação farmacêutica e amostras de urina por voltametria de onda quadrada. A faixa linear foi de $5,0 \times 10^{-7}$ a $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e o limite de detecção de 0,025 ng mL⁻¹ (LEVENT, 2012).

Medeiros *et al.* (2012) através da voltametria de pulso diferencial (DPV) utilizaram EDDB (pré-tratado catodicamente) para

determinar simultaneamente dois pares de corantes sintéticos: tartrazina (TT) e amarelo-sol (SY), e azul brilhante (BB) e amarelo-sol (SY). Os valores dos limites de detecção obtidos para a determinação simultânea de TT e SY, e BB e SY foram 62,7 e 13,1 nmol L⁻¹, e 143 e 25,6 nmol L⁻¹, respectivamente. O método proposto foi aplicado na determinação simultânea destes corantes em produtos alimentares.

Pereira *et al.* (2012) desenvolveram um método eletroquímico para a determinação de bisfenol A (BPA) através da voltametria de pulso diferencial e utilizando EDDB. A faixa linear foi de 0,44 a 5,2 mmol L⁻¹ e o limite de detecção de 0,21 mol L⁻¹.

Um método sensível e seletivo para a determinação da cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro foi desenvolvido por Švorc *et al.* (2012a). A resposta linear da corrente de pico com a concentração foi de 4×10^{-7} a $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, e o limite de detecção de $1,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Os ensaios foram realizados sem qualquer pré-tratamento para ativação da superfície do eletrodo. O método proposto foi aplicado com sucesso para a determinação de cafeína em amostras de bebidas disponíveis comercialmente.

O mesmo grupo utilizou EDDB para determinação simultânea de paracetamol e penicilina V. As curvas de calibração para a determinação simultânea de paracetamol e penicilina V exibiram respostas lineares na faixa de concentrações de 0,4 - 100 µmol L⁻¹ para ambos os fármacos. O limite de detecção foi estabelecido de 0,21 e 0,32 mmol L⁻¹ de paracetamol e penicilina V, respectivamente. A utilidade prática analítica do método proposto foi demonstrada por determinação simultânea de paracetamol e penicilina V em amostras de urina humana. (ŠVORC *et al.* 2012b)

2.3 MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS

A voltametria compreende um grupo de métodos eletroquímicos que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial. Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar (SKOOG *et al.*, 2002). O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente

resultante (i). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e consequentemente, na célula eletroquímica.

Um eletrodo atrai predominantemente espécies carregadas positivamente ou negativamente, que podem ou não reagir na sua superfície. Espécies neutras também interagem com o eletrodo via adsorção. A reação eletródica é composta por uma série de etapas e para se descrever qualquer processo eletródico deve ser considerado primeiro, o transporte das espécies até a superfície do eletrodo e segundo, a reação que ocorre no eletrodo. Assim, a corrente (ou velocidade da reação eletródica) é governada por processos como a transferência de massa (transferência da espécie do seio da solução para a interface eletrodo-superfície); a transferência de carga (transferência de elétrons na superfície do eletrodo); as reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de elétrons que podem por sua vez ser homogêneos (protonação, dimerização etc) ou heterogêneos (decomposições catalíticas, adsorção, desorção, cristalização) (WANG, 1994).

O transporte de massa da solução ao eletrodo de trabalho é governado por três fatores: difusão (movimento devido à influência da concentração, isto é, da região de alta concentração para região de baixa concentração); convecção (movimento físico, devido à agitação, vibração ou gravidade); e migração (movimento de partículas ao longo de um campo elétrico) (BARD e FAULKNER, 1980).

A corrente observada na interação do analito com o eletrodo (oxirredução) é a faradaica (denominada assim por obedecer a lei de Faraday), e é proporcional à concentração de analito eletroquimicamente ativo no seio da solução. O outro tipo de corrente, a corrente capacitiva, não é proporcional à concentração do analito e nem obedece à lei de Faraday (não-faradaica), é apenas uma corrente gerada devido à presença de um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, aumentando a carga da dupla camada elétrica (corrente transiente causada por mudanças na superfície do eletrodo e da solução) (BARD e FAULKNER, 1980).

Para que seja possível determinar um analito por voltametria é necessário que o mesmo seja eletroativo, ou seja, que oxide ou reduza em uma região de potencial aplicado na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinamicamente ou cineticamente, criando-se um fluxo de elétrons (WANG, 1994). Nesse caso, a corrente faradaica deve

ser medida em um ambiente de baixo ruído, que é formado pelas correntes não-faradaicas e por correntes faradaicas resultantes de processos de oxirredução de outras espécies na solução da cela de trabalho (eletrólito suporte, componentes da amostra, gases dissolvidos).

As correntes não-faradaicas podem ser minimizadas pelo uso de eletrodos de pequena área.

No caso das correntes faradaicas não-específicas do analito, o uso de eletrodo polarizado garante que nenhuma transferência de carga possa ocorrer entre o eletrodo e a solução de eletrólito suporte em função do potencial aplicado. A seletividade do eletrodo em condições experimentais específicas também evita que a corrente faradaica proveniente de substâncias potencialmente interferentes se manifestem.

O potencial aplicado no eletrodo de trabalho atua como a força motriz para a reação eletroquímica. É o potencial controlado que possibilita a espécie presente na solução ser oxidada ou reduzida na superfície do eletrodo. Na medida em que o potencial se torna mais negativo que o E° da espécie eletroativa, o eletrodo se torna uma fonte de elétrons favorecendo a redução das espécies na interface solução-eletrodo. No caso de um potencial mais positivo que o E° da espécie eletroativa a oxidação das espécies será favorecida. Por esta razão, quando se faz uma variação de potencial no sentido negativo usa-se a denominação de variação de redução, enquanto que uma variação de potencial no sentido positivo é a variação de oxidação (WANG, 1994).

A corrente elétrica surge quando o potencial aplicado atinge um valor tal que permite a reação de oxirredução do analito. Se essa corrente elétrica for proporcional à quantidade das espécies que reagem, pode-se fazer uso desse fenômeno do ponto de vista analítico quantitativo.

A corrente faradaica i proveniente da oxirredução do analito na superfície do eletrodo é dada por:

$$i = zF \, dn/dt \quad (1)$$

Onde: z - número inteiro de sinal e magnitude da carga iônica da espécie eletroativa

F - a constante de Faraday

dn/dt - a taxa de variação de mols da espécie eletroativa.

Considerando-se a taxa de variação dn/dt como o produto entre o fluxo de espécies eletroativas (J) e a área da seção reta (A), tem-se que a corrente instantânea é:

$$i = zFAJ \quad (2)$$

Na voltametria, as espécies ativas chegam ao eletrodo primariamente por difusão, pois outras formas de transporte de massa são propositalmente limitadas.

Nesse caso J é dependente do tempo e é descrito pela primeira lei de Fick, sendo J o produto entre o coeficiente de difusão, D , multiplicado pela variação de concentração na interface eletrodo-solução (no qual a distância, x , entre a superfície do eletrodo e a solução é zero).

$$J = D \, dc^0 / dx \quad (3)$$

Assim a corrente é limitada por difusão ou está sob controle difusional. As espécies envolvidas no processo são iônicas (fluxo envolvendo transferência de carga) e a corrente pode ser expressa por:

$$i = z FAD \, dc^0 / dx \quad (4)$$

Similarmente, se o fluxo de espécies para o eletrodo não envolve transferência de carga (transferência de cátions ou ânions), mas é adsorptivo, tem-se um processo heterogêneo controlado cineticamente. A adsorção é um processo heterogêneo e o fluxo de espécies eletroativas pode ser descrito como uma etapa cinética de primeira ordem (equação 5). Nesse caso, tem-se também uma relação em que a corrente é proporcional à concentração da espécie de interesse.

$$i = zFAk_h c^0 \quad (5)$$

Onde: k_h - uma constante de velocidade heterogênea
 c^0 - concentração de espécies na superfície do eletrodo em um dado instante.

Como na camada externa existe um gradiente de concentração aproximadamente constante, dc/dx é igual à diferença entre a concentração de analito na dupla camada e a concentração no seio da

solução ($c - c^0$) dividido por dx , que equivale à largura da camada de difusão (δ), assim:

$$dc^0/dx = c - c^0/\delta \quad (6)$$

Substituindo (6) em (4), tem-se:

$$i = zFAD (c - c^0)/\delta \quad (7)$$

Quando a corrente é limitada por difusão, o material que chega à superfície do eletrodo é imediatamente reduzido ou oxidado mantendo sua concentração, c^0 , praticamente nula. Assim, a equação 7 pode ser simplificada, no caso de processo catódico, para:

$$i = -zFAD (D_{ox} c_{ox})/\delta \quad (8)$$

E para processo anódico:

$$i = zFAD (D_{red} c_{red})/\delta \quad (9)$$

Para sistemas controlados pelas leis da termodinâmica, o potencial do eletrodo (E) pode ser usado para estabelecer a concentração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo, de acordo com a equação de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{nF} \times \log \frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \quad (10)$$

Onde: E^0 - potencial padrão da reação

R - constante dos gases

T - temperatura, K

n - número de mols de elétrons transferido na reação, e

c_{Ox} e c_{Red} concentrações superficiais das espécies oxidada e reduzida, respectivamente.

A forma como o potencial é aplicado, e por consequência a forma como o sinal analítico (corrente) é adquirido, irá denominar o tipo de técnica voltamétrica em questão. O modo de aquisição repercute na sensibilidade da técnica principalmente devido à magnitude da corrente

capacitiva observada para cada caso e também na seletividade devido ao formato do voltamograma e à largura dos pulsos de resposta medidos. Além do modo de aquisição, as técnicas voltamétricas variam de acordo com as etapas utilizadas antes ou durante a medida do sinal, tais como a pré-concentração de analito (proveniente da capacidade do analito em reagir ou adsorver com o material do eletrodo de trabalho) ou direção ou inversão da direção da variação de potencial.

A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa/qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho.

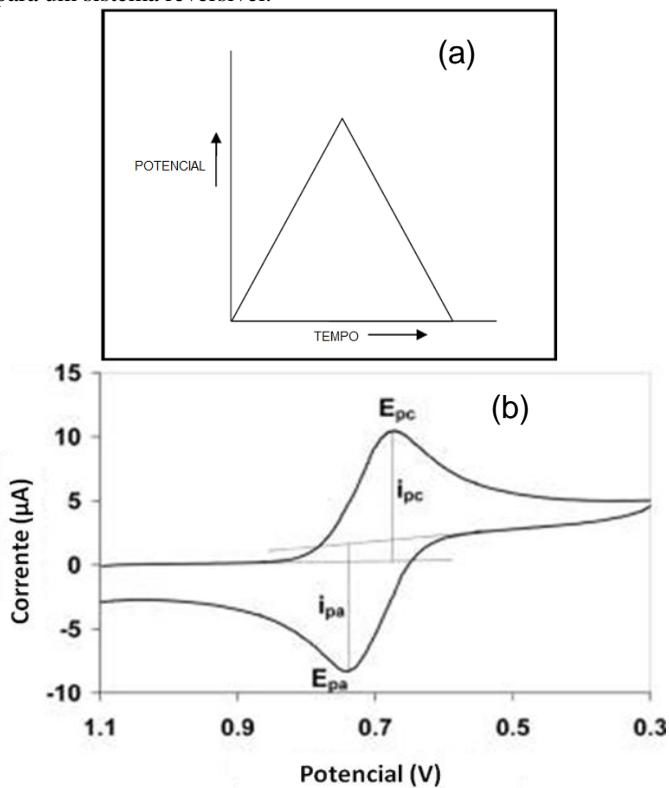
2.3.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta na sua habilidade em fornecer rapidamente informações sobre o sistema estudado. É possível determinar o número de mols de elétrons envolvidos na reação de oxirredução, a constante de velocidade heterogênea, o potencial formal, coeficiente de difusão e o mecanismo de reação.

Esta técnica consiste na variação linear de potencial de um eletrodo de trabalho estacionário. Essa variação ocorre de forma triangular (representada na Figura 2a) e se inicia em valor no qual nenhuma reação ocorre, seguindo até o potencial de inversão e retornando, geralmente ao potencial inicial (WANG, 1994).

A Figura 2b ilustra a resposta de corrente quando uma espécie que pode ser oxidada e reduzida, no intervalo de potencial aplicado, é sujeita a um sinal de excitação cíclica como mostrado na Figura 2a. As informações importantes que podem ser extraídas de um voltamograma cíclico são: potencial de pico catódico (E_{pc}), potencial de pico anódico (E_{pa}), corrente de pico catódica (i_{pc}) e corrente de pico anódica (i_{pa}).

Figura 2: (a) Forma da aplicação da voltametria cíclica (b) Voltamograma cíclico para um sistema reversível.



Fonte: SOUZA *et al.*, 2003

2.3.1.1 Sistemas reversíveis

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, o processo redox segue exatamente as condições previstas pela equação de Nernst (Equação 10), pois como a cinética da reação de transferência de carga é rápida, apenas a etapa de transferência de massa irá determinar as regras do processo.

Neste caso, a corrente de pico é dada pela equação de Randles-Sevcik (Equação 12).

$$i_p = (2,686 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (11)$$

Onde: n - é o número de mols de elétrons envolvidos no processo,

A - a área do eletrodo (cm^2),

D - o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$),

C - a concentração da espécie eletroativa no interior da solução (mol cm^{-3})

ν - a velocidade de variação do potencial (V s^{-1})

(WANG, 1994).

Existem ainda vários critérios para diagnosticar se um sistema eletroquímico comporta-se reversivelmente, dentre eles (BARD e FAULKNER, 1980): as correntes de pico catódica e anódica são aproximadamente iguais em módulo; a diferença entre os potenciais de pico, ΔE_p , é definida por:

$$\Delta E_p = |E_{p_{ox}} - E_{p_{red}}| = 0,059/n \quad (12)$$

2.3.1.2 Sistemas irreversíveis

Para processos irreversíveis, a velocidade de transferência de carga é lenta quando comparada com a velocidade de variação de potencial, e as concentrações das espécies oxidadas (Ox) e reduzidas (Red) não serão mais função apenas do potencial, portanto não possui um comportamento Nernstiano. Neste caso, o coeficiente e a velocidade de transferência de carga devem ser considerados. Nestas circunstâncias, a equação que descreve a corrente de pico é dada pela Equação 13.

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} ACD^{1/2} v^{1/2} \quad (13)$$

Os critérios para diagnosticar a irreversibilidade de um sistema são (BRETT, 1993): ausência de pico na variação reversa de potencial; E_p desloca-se de $30/n$ (mV) para cada 10 vezes de aumento na velocidade de variação.

O potencial neste caso é definido por:

$$|E_p - E_{p/2}| = 0,0477 / \alpha n \quad (14)$$

Com fins de caracterização das reações (reversíveis ou irreversíveis), outras inferências podem ser feitas a partir dos valores de corrente e velocidade de variação do potencial. Analisando-se a inclinação de curvas $\log i$ em função do $\log v$, pode-se concluir que: um comportamento linear com inclinação igual a 0,5 caracteriza o processo como controlado por difusão; inclinação igual a 1 caracteriza o processo como controlado por adsorção.

Para reações reversíveis ou não, sem implicações cinéticas, ao plotar-se i em função de $v^{1/2}$ observa-se comportamento linear com a reta passando pela origem.

2.3.2 Voltametria de onda quadrada

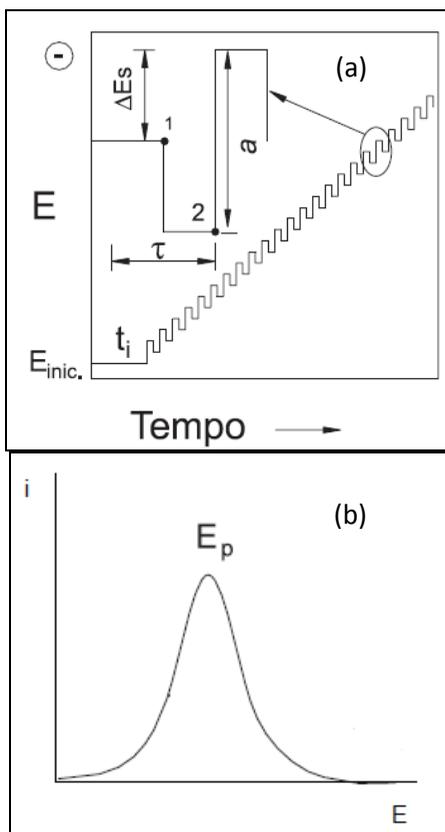
A voltametria de onda quadrada (VOQ) foi desenvolvida por Baker (RAMALEY, 1969; NUWER *et al.*, 1991; BRETT, 1993) em 1952, e no decorrer dos anos sofreu modificações instrumentais aliadas ao desenvolvimento de novas teorias que foram responsáveis pelo estabelecimento da técnica para análise de traços e na obtenção de dados relacionados à cinética e ao mecanismo de reações químicas sob várias condições (SOUZA *et al.*, 2003).

Esta é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis, apresenta menor consumo de espécie eletroativa, diminuição dos problemas associados ao bloqueio da superfície do eletrodo por produtos de reação e os limites de detecção podem ser comparados, em determinadas situações, aos das técnicas cromatográficas. Além disso, a análise dos resultados também possibilita a avaliação cinética e mecanística considerando-se espécies adsorvidas ou não à superfície do eletrodo de trabalho (RAMALEY, 1969; SOUZA *et al.*, 2003).

Uma característica desta técnica é a possibilidade de apresentar a corrente gerada na forma de um pico simétrico, de maior intensidade que as ondas obtidas por polarografia de corrente direta ou voltametria cíclica e a habilidade em medir as correntes faradaicas em um tempo em que as correntes capacitivas são desprezíveis, um dos motivos pelos quais a técnica se mostra tão sensível em relação às outras (SILVA, 2006). Tem sido aplicada em reações envolvendo adsorção de compostos orgânicos e permite estudar a redução irreversível dos materiais adsorvidos (O'DEA *et al.*, 1993).

Na voltametria de onda quadrada, a forma da curva corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_S (incremento de variação de potenciais) que variam de acordo com uma escada de potencial com amplitude de pulso a e duração $2t$ (período). Na curva de potencial - tempo, a largura de pulso ($t/2$) é chamada τ e a frequência de aplicação dos pulsos é chamada de f e é dada por ($1/t$). As correntes elétricas são determinadas duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da variação, e outro ao final do pulso reverso. Figura 3 representa esquematicamente a aplicação do pulso nessa técnica. O sinal é obtido como uma intensidade de corrente resultante (Δi) de forma diferencial e apresenta excelente sensibilidade, pois esta amostragem garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente resultante (SOUZA *et al.*, 2003).

Figura 3: (a) Representação da aplicação do pulso na voltametria de onda quadrada; (b) Voltamograma de onda quadrada.



Fonte: SOUZA *et al.*, 2003

As curvas de corrente em função do potencial são geralmente simétricas, apresentando perfil gaussiano, isso porque somente ao final do semiperíodo a medida de corrente é realizada (SOUZA *et al.*, 2003).

Assim como na voltametria cíclica, os parâmetros eletroquímicos, corrente de pico e potencial de pico fornecem informações importantes quando relacionados com a frequência de aplicação de pulsos.

A voltametria de onda quadrada também permite, assim como a voltametria cíclica, caracterizar o comportamento químico das espécies de trabalho.

A adsorção de reagentes ou produtos em qualquer reação redox pode causar um aumento significativo nas respostas da voltametria de onda quadrada, quando comparadas àquelas obtidas por outras técnicas de pulso, especialmente se o sistema é irreversível ou quase-reversível.

Reações redox totalmente irreversíveis são muito importantes em eletroanálise, pois muitos compostos orgânicos, normalmente contendo anéis aromáticos homocíclicos ou heterocíclicos com grupos ligantes eletroativos, sofrem reduções totalmente irreversíveis devido à baixa velocidade de transferência de carga ou muitas vezes por inativação rápida do produto de reação.

Uma avaliação das respostas voltamétricas obtidas com a voltametria de onda quadrada mostra que se uma reação redox ocorre a partir de um reagente dissolvido, a corrente faradaica decresce muito mais lentamente que a corrente capacitiva. Assim, estas duas componentes podem ser separadas, se a medida é realizada ao final de cada pulso. No entanto, se a reação redox ocorre a partir de um reagente adsorvido, a relação corrente faradaica-tempo depende do grau de reversibilidade da reação e também do potencial do eletrodo de trabalho.

Osteryoung e Lovric realizaram cálculos teóricos, pela simulação de reações reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis.

Estes cálculos teóricos demonstraram que as características dos voltamogramas teóricos (i_p , E_p e $\Delta E_{p/2}$ – largura do pico a meia altura) dependem linearmente de alguns parâmetros utilizados na VOQ e do tipo de sistema redox. Observou-se que a forma do voltamograma na VOQ pode ser normalizado em função da razão entre a corrente de pico (i_p) e largura do pico a meia altura ($\Delta E_{p/2}$) e que o potencial de pico depende inteiramente do produto an . Com isto, eles puderam observar que mantendo-se constante um parâmetro e variando-se todos os outros, seria possível estudar as relações de proporcionalidade entre cada uma das variáveis e seu comportamento em cada tipo de sistema em estudo.

De acordo com a teoria da VOQ, a magnitude, perfil e posição dos picos redox dependem do grau de reversibilidade e do valor do coeficiente de transferência eletrônica da espécie eletroativa, sendo que o caráter da reação redox pode causar um aumento ou diminuição significativa na resposta obtida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver novas metodologias simples, rápidas, de baixo custo, sensíveis, seletivas, precisas e exatas para a determinação direta de hormônios sexuais femininos em formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e produtos lácteos utilizando para tal eletrodo de diamante dopado com boro associado à voltametria de onda quadrada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar diferentes hormônios sexuais (estriol e estrona) para determinação analítica;
- ✓ Avaliar comparativamente os eletrodos de platina, ouro, cobre e carbono vítreo com o eletrodo de diamante dopado com boro, quanto à sensibilidade e qualidade do sinal analítico;
- ✓ Utilizar a técnica de voltametria cíclica para caracterização eletroquímica dos processos oxirredutivos;
- ✓ Utilizar a voltametria de onda quadrada para o desenvolvimento da metodologia analítica usando eletrodo de diamante dopado com boro;
- ✓ Otimizar os parâmetros experimentais, tais como tempo de ativação e limpeza do eletrodo de trabalho, eletrólito suporte, pH, velocidade de variação do potencial, frequência, amplitude e incremento de pulso na voltametria de onda quadrada;
- ✓ Selecionar diferentes amostras, entre formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e produtos lácteos para aplicação dos métodos desenvolvidos;
- ✓ Aplicar as metodologias desenvolvidas em amostras previamente escolhidas;
- ✓ Validar os métodos propostos utilizando outros métodos como comparativo e através de cálculos estatísticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

4.1.1 Reagentes

Os padrões dos hormônios utilizados nos experimentos (sem purificação prévia) foram: estriol e estrona obtidos da Sigma-Aldrich, com grau de pureza de 93,0 e 96,0%, respectivamente.

Utilizaram-se os seguintes reagentes com grau de pureza analítico para a preparação das soluções de eletrólito suporte: hidróxido de sódio, hidróxido de lítio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio, ácido acético, ácido bórico, ácido clorídrico, ácido ortofosfórico (Merck), cloreto de amônio, acetato de sódio, monohidrogenofosfato de sódio e dihidrogenofosfato de sódio (Vetec).

Para o preparo das soluções estoque dos padrões usou-se álcool metílico e etílico. O álcool etílico também foi utilizado para preparação das amostras lácteas.

O estudo de interferentes foi realizado testando-se os reagentes progesterona (Sigma-Aldrich), uréia, ácido úrico (Qhemis), creatinina e albumina.

4.1.2 Soluções

Para lavagem da vidraria de trabalho preparou-se soluções de ácido nítrico (10%); para ativação e limpeza do eletrodo de trabalho, ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (Vetec).

Soluções estoque de estriol $1,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (em metanol) e estrona $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (em etanol) utilizadas nos experimentos foram preparadas e estocadas sob refrigeração até sua utilização. Estas soluções apresentaram estabilidade durante todo tempo de estocagem (entre 4 e 5 meses de acompanhamento).

Soluções diluídas de estriol na concentração desejada (entre $2,0 \times 10^{-7}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e de estrona (entre $4,0 \times 10^{-8}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição de alíquotas da solução estoque.

Soluções de hidróxido de sódio, de lítio e de potássio, utilizadas como eletrólito suporte, foram preparadas na concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e diluídas para $5,0 \times 10^{-2}$ e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções tampão usadas como eletrólito suporte foram preparadas da seguinte forma:

Tampão Acetato: ajustando-se uma solução de acetato de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ com solução de ácido acético $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para o pH desejado.

Tampão de amônia: ajustando-se uma solução de hidróxido de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ com solução de cloreto de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para o pH desejado.

Tampão Britton-Robinson (B-R): mistura de ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck), ácido bórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) e ácido ortofosfórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck). O ajuste do pH desejado foi feito com hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) ou ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Qhemis).

Tampão fosfato: misturando-se 2,90 g de dihidrogenofosfato de sódio e 5,16 g de monohidrogenofosfato de sódio para 100 mL.

Tampão Ringer: mistura de fosfato trissódico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH era ajustado utilizando uma solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.3 Amostras

4.1.3.1 Amostra de urina para determinação de estriol

A amostra de urina utilizada nesse trabalho foi obtida de uma mulher em seu terceiro trimestre de gestação. A coleta foi realizada segundo recomendação da resolução ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) nº. 302/ 2005 e foi adotado o seguinte procedimento: toda a urina expelida num período de 24 h foi recolhida em um recipiente previamente esterilizado, contendo uma solução 1% de ácido nítrico e preservada a $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O volume total de amostra coletada foi de 1,6 L e não foi necessário nenhum tipo de pré tratamento para análise dessa amostra.

4.1.3.2 Amostra de formulação farmacêutica para determinação de estriol

O estriol disponível comercialmente (Ovestrion®) era disposto na forma de comprimido e continha, segundo o fabricante, 1 mg de estriol. Dez comprimidos desse medicamento foram macerados num almofariz com um pistilo. O pó foi pesado na quantidade equivalente a 5 comprimidos e utilizado para a preparação de 25 mL de solução da

amostra em metanol. A solução foi homogeneizada sob agitação em ultrassom por 5 min. e logo em seguida deixada em repouso para que excipientes não-dissolvidos fossem decantados. Uma alíquota de 15 mL foi então retirada posteriormente a partir da solução sobrenadante e essa, por sua vez, utilizada para os ensaios de quantificação do estriol.

4.1.3.3 Amostras de produtos lácteos para determinação de estrona

Foram analisadas amostras de leite tipo B, nata e manteiga, ambas de produção industrial.

Todas as amostras foram submetidas a um pré tratamento que consistiu no preparo de uma mistura (1:1) amostra-etanol, segundo recomendação da instrução normativa DAS nº. 22/2003. Esse pré tratamento com etanol inibe a interferência das proteínas, gorduras e lactose encontradas nesse tipo de amostra.

Após agitação de 5 min., a amostra era centrifugada por 15 min. numa rotação de 1600 rpm e em seguida, uma alíquota do sobrenadante era retirada e analisada.

4.2 CÉLULA E ELETRODOS

Foi utilizado um sistema eletroquímico convencional constituído de três eletrodos: o eletrodo de trabalho era um eletrodo de diamante dopado com boro (área $0,23 \text{ cm}^2$ e dopagem de 8.000 ppm de boro), uma placa de platina foi utilizada como contra-eletrodo; como eletrodo de referência, um de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl). A célula de trabalho era de vidro com volume de 25 mL e tampa de teflon.

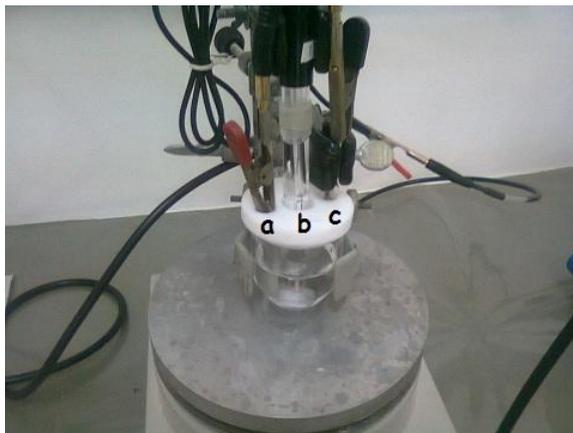
Foram também testados outros quatro eletrodos de trabalho: cobre, platina, ouro e carbono vítreo com o objetivo de estabelecer comparação qualitativa e quantitativa com relação à sensibilidade destes, face ao eletrodo de diamante dopado com boro.

Para obtenção de dados mais reprodutíveis foi realizado pré-tratamento na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro. O procedimento consistiu numa polarização em $-3,0 \text{ V}$ numa solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ por 3 minutos em célula distinta da utilizada para as determinações.

As medidas de corrente eram feitas em célula eletroquímica não desaerada e em temperatura ambiente.

A Figura 4 apresenta a célula montada e os eletrodos utilizados.

Figura 4: Célula eletroquímica utilizada para realização dos experimentos. a) eletrodo de diamante dopado com boro; b) eletrodo de Ag/AgCl e c) placa de platina.



4.3 INSTRUMENTOS

As medidas eletroanalíticas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato Voltalab PGZ 100, acoplado a um microcomputador utilizando o programa Voltmaster 4.

Foi utilizada a voltametria cíclica para realização dos estudos preliminares de caracterização dos processos de oxirredução, no tocante aos dois hormônios propostos. Para desenvolvimento das metodologias eletroanalíticas foi utilizada a voltametria de onda quadrada.

Todas as medidas de pH foram realizadas em um eletrodo de vidro combinado conectado a um pH-metro digital (modelo 720 A/ Orion). A água desionizada foi obtida em um sistema de Milli-Q (Bedford, MA, Millipore).

Foram utilizados um ultrassom (Modelo 14/ METASOM) para a dissolução dos reagentes, e, quando necessário, um agitador magnético (modelo DI-03/ DIST) para a agitação da célula eletroquímica.

Para separação das proteínas precipitadas no tratamento das amostras de produtos lácteos foi usada uma centrífuga (Modelo 206 BL /FANEM).

4.4 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO

Os parâmetros requeridos para a validação dos métodos analíticos foram: seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão (repetibilidade), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A seletividade foi avaliada através de estudos de interferentes e pela técnica da adição de padrão analítico comparando as inclinações da curva de calibração e da curva de determinação.

A linearidade foi demonstrada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico.

A sensibilidade foi observada através do coeficiente angular da curva de calibração. A exatidão foi averiguada através da comparação do método proposto com um método de referência (utilizou-se o radioimunoensaio) e na realização de ensaios de recuperação na matriz. No estudo da precisão, além do cálculo do desvio-padrão relativo foram realizados testes de significância, utilizando o teste "t" de Student e o teste F.

A repetibilidade foi avaliada através do desvio-padrão de 10 medidas de uma mesma concentração da solução padrão e também foi calculada utilizando duas metodologias: interdía e intradía com n igual a 5. Os resultados serão expressos através do coeficiente de variação.

O erro relativo calculado entre os valores dos métodos eletroanalíticos e o método do radioimunoensaio (comparativo) a fim de observar a exatidão dos métodos propostos, foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$Er = \frac{X_i \times X_v}{X_v} \times 100$$

Onde: X_i – valor obtido pelo método eletroanalítico

X_v – valor obtido pelo método do radioimunoensaio

Os limites de detecção e quantificação foram determinados através do desvio-padrão do coeficiente linear e do coeficiente angular da curva de calibração.

O limite de detecção (LD) foi expresso pela equação:

$$LD = \frac{3,0 \times s}{S} \quad (15)$$

O limite de quantificação (LQ) foi expresso pela equação:

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad (16)$$

Onde: s - desvio-padrão do coeficiente linear;

S - coeficiente angular da curva de calibração (sensibilidade do método).

4.5 ESTUDO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Todos os estudos com eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) foram realizados transferindo-se 20,0 mL da solução do eletrólito suporte para a célula eletroquímica, em seguida voltamogramas do branco foram registrados mediante variação de potencial em um intervalo pré-estabelecido.

Depois de registrado o voltamograma do branco, uma alíquota da solução estoque do padrão era adicionada na célula, registrando os voltamogramas de acordo com o mesmo procedimento anteriormente citado.

Antes de cada medida experimental o eletrodo de trabalho foi submetido à limpeza eletroquímica na própria solução de determinação aplicando-se um potencial de -3,0 V por 30 s quando trabalhado com o estriol, e 40 s quando trabalhado com a estrona, tempo suficiente para regeneração da superfície, como mostrado no próximo capítulo, de acordo com estudo de tempo de limpeza realizado para ambos os hormônios.

4.5.1 Determinação de estriol em amostra de urina e formulação farmacêutica

Para a determinação de estriol nas amostras de urina e formulação farmacêutica, o método utilizado foi o da adição de padrão.

Após o registro do branco (sem adição de amostra nem padrão), aplicando-se um potencial no sentido da oxidação que variou de 0,0 a 0,8 V vs Ag/AgCl, uma alíquota da solução da amostra foi adicionada na célula eletroquímica contendo 20 mL do eletrólito suporte e registrou-se os voltamogramas de onda quadrada para a amostra.

A seguir, adições sucessivas do padrão de estriol foram realizadas e registrados os voltamogramas após cada adição. A quantificação foi obtida plotando-se o gráfico Δj vs. [estriol] adicionada.

4.5.2 Determinação de estrona em amostra de produtos lácteos

Inicialmente, uma alíquota de 20 mL da solução do eletrólito suporte foi pipetada e introduzida na célula eletroquímica. Em seguida, o voltamograma do branco foi obtido a partir da varredura de potencial entre 0,0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl.

O método utilizado nesses ensaios também foi o da adição de padrão e seguiu o mesmo procedimento realizado na metodologia de quantificação de estriol.

Os resultados obtidos pelas metodologias eletroanalíticas desenvolvidas neste trabalho foram comparados com os resultados da metodologia do radioimunoensaio. Essas determinações foram realizadas em laboratório de análises clínicas na cidade de Tubarão – SC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram realizados estudos de solubilidade dos hormônios estriol e estrona em diferentes solventes orgânicos, uma vez que estes hormônios apresentam baixa solubilidade em meio aquoso. De acordo com os estudos realizados, verificou-se que o estriol foi muito solúvel em metanol e pouco solúvel em acetona e etanol. A estrona apresentou-se solúvel em etanol e metanol e pouco solúvel em acetona. Optou-se, portanto, na preparação de soluções de estriol em metanol e de estrona em etanol.

A seguir, buscou-se otimizar o modo de ativação do eletrodo de trabalho a fim de melhorar o desempenho do mesmo. Para tanto, variou-se tempo e potencial de ativação.

Por fim, investigou-se o comportamento voltamétrico de ambos os hormônios monitorando-se a oxidação, uma vez que as moléculas (Fig. 1) apresentam em suas estruturas grupos passíveis de oxidação. Deste modo, serão apresentados os estudos eletroquímicos separadamente para cada hormônio, visando desenvolver métodos eletroanalíticos com diferentes aplicações.

5.1 ESTUDOS REFERENTES AO HORMÔNIO ESTRIOL

5.1.1 Escolha do eletrodo

A fim de comparar a oxidação eletroquímica do estriol, foram testados como eletrodos de trabalho o cobre, a platina, o ouro, o carbono vítreo e o diamante dopado com boro. Nesse estudo, as medições por voltametria linear foram realizadas aplicando-se potencial na faixa de 0,0 - 0,63 V numa velocidade de 50 mVs^{-1} em estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e como eletrólito suporte solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).

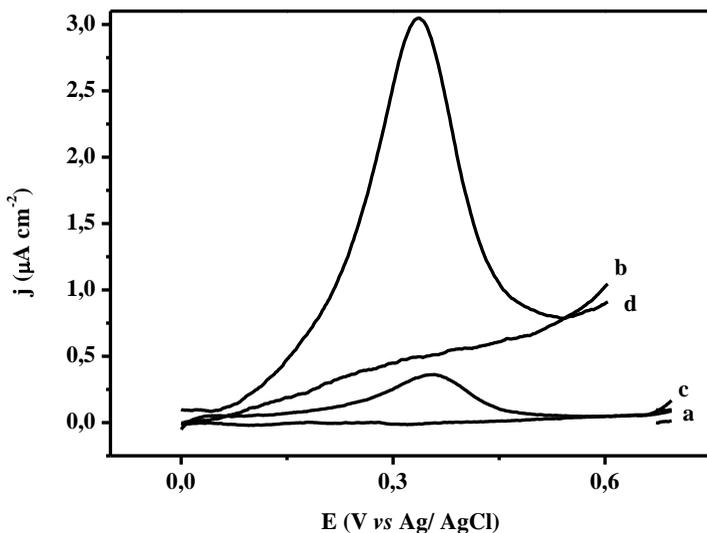
Nessas condições experimentais, o estriol foi eletroquimicamente inativo sobre eletrodos de platina, cobre e ouro, uma vez que nenhum pico de oxidação foi observado. Por outro lado, como pode ser visto na Fig. 5, os voltamogramas obtidos sobre o carbono vítreo (c) e o EDDB (d) com estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ mostram que a oxidação eletroquímica do estriol produziu um pico de corrente anódica bem definido. No entanto, a corrente de pico no EDDB foi quase 10 vezes maior do que a do eletrodo de carbono vítreo.

Comportamento semelhante tem sido sistematicamente observado por outros autores para este tipo de eletrodo e para outras biomoléculas (CODOGNOTO *et al*, 2002 e USLU *et al*, 2008). O bom

desempenho de eletrodos EDDB como catalisadores eletroquímicos é devido a propriedades como a baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido e baixas correntes de fundo. A corrente de fundo capacitiva, por exemplo, é dez vezes mais baixa do que de eletrodos de carbono vítreo (DUO *et al*, 2000), sendo os eletrodos do EDDB muito sensíveis a oxidação / redução de moléculas orgânicas. Este estudo confirma, portanto, que o eletrodo EDDB também oferece excelentes propriedades electrocatalíticas para a oxidação de hormônios, em particular o estriol, que é aqui estudado pela primeira vez, com utilização deste tipo de superfície do eletrodo.

Assim, o eletrodo EDDB foi selecionado para desenvolver a metodologia para a determinação eletroquímica de estriol.

Figura 5: Voltamogramas obtidos para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando o eletrodo de carbono vítreo (c) e o EDDB (d) onde (a e b) são o branco.

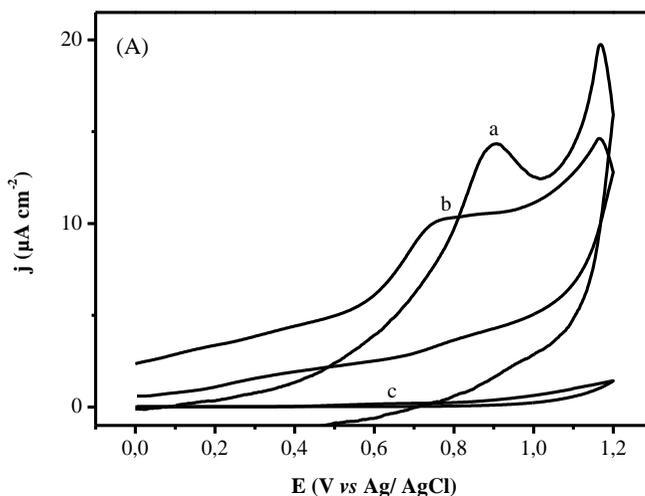


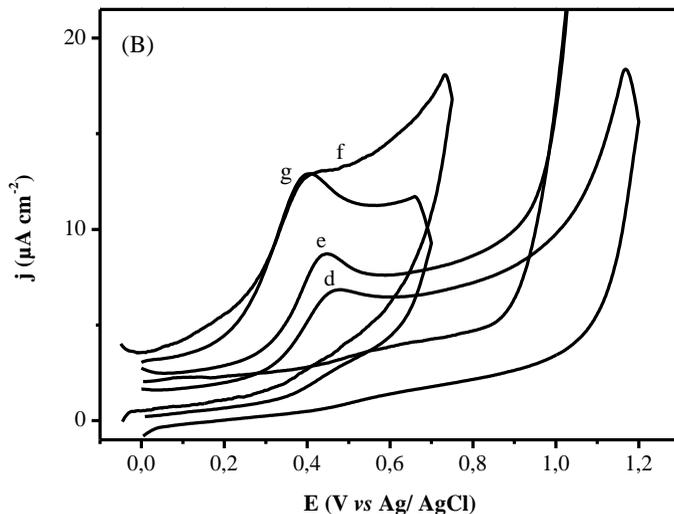
5.1.2 Escolha do eletrólito suporte

A escolha do eletrólito suporte é uma etapa importante nos estudos eletroanalíticos, pois sua composição e pH afetam as propriedades da solução, bem como da interface eletrodo-solução, modificando a termodinâmica e cinética do processo de transferência de carga e da adsorção na superfície do eletrodo (AGOSTINHO *et al*, 2004).

No presente estudo, as soluções com diferentes composições e valores de pH foram testadas como eletrólito suporte para investigar a oxidação do estriol em um eletrodo EDDB. Portanto, o tampões Britton-Robinson (pH 2,0 - 12,0), acetato (pH 4,5), amônio (pH 9,4) e Ringer (pH 12,0) e o NaOH (pH 12,0) foram avaliados. Todas estas soluções tinham uma concentração inicial de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As Figuras 6 A e B apresentam os voltamogramas cíclicos obtidos para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte.

Figura 6: Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) do estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes soluções e pHs usando EDDB: (6.A) (a) tampão Britton-Robinson (pH 2,0); (b) tampão acetato (pH 4,5); (c) tampão Britton-Robinson (pH 7,0); (6.B) (d) tampão amônia (pH 9,4), (e) tampão Ringer (pH 12,0), (f) tampão Britton-Robinson (pH 12,0), e (g) NaOH (pH 12,0).





Em todos os voltamogramas, apenas um pico de oxidação foi observado quando o potencial foi varrido de 0,0 - 1,2 V e de volta para 0,0 V a uma velocidade de variação de 100 mVs^{-1} .

Como podemos observar, o estriol é oxidado a um potencial elevado de 0,90 V em tampão Britton-Robinson (pH 2,0) (Fig. 6.A (a)); foram observados um pico bem definido de oxidação e um bom sinal analítico, com alta densidade de corrente anódica.

Em tampão acetato (pH 4,5) (Fig. 6.A (b)), a oxidação de estriol foi observada em 0,75 V com uma densidade de corrente produzida menor.

Um pico mal definido e de baixa densidade de corrente foi gerado em 0,64 V em tampão Britton-Robinson (pH 7,0) (Fig. 6.A (c)). A oxidação do estriol no tampão amônia (pH 9,4) (Fig. 6 (d)) e em solução tampão Ringer (pH 12,0) (Fig. 6.B (e)) foi observada aproximadamente no mesmo potencial de 0,45 V e apesar dos picos bem definidos, os sinais analíticos foram pobres.

Em tampão Britton-Robinson (pH 12,0), um pico com baixa densidade de corrente e mal definido foi observado em 0,40 V (Fig. 6.B (f)).

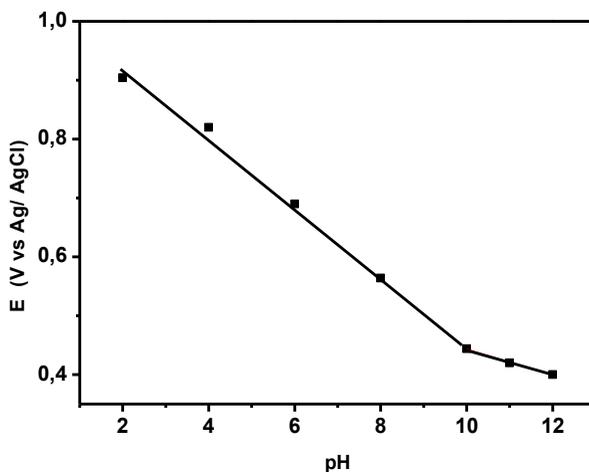
O pico de oxidação mais bem definido e com mais alta densidade de corrente anódica foi obtido em NaOH (pH 12,0) (Fig. 6.B

(g). Sob esta condição experimental, o hormônio estriol foi oxidado no potencial mais baixo observado, 0,38 V.

A densidade de corrente de pico mais elevada encontrada para a oxidação de estriol em soluções de pH 12,0 sugere que a reação eletroquímica segue um mecanismo diferente em relação a soluções de pH mais baixo, e também com um número diferente de elétrons envolvidos. Como pode ser visto na Fig. 6, os voltamogramas cíclicos são deslocados para potenciais menos positivos quando o pH da solução aumenta. Como consequência, a reação de oxidação da água foi antecipada e um voltamograma cíclico estreito foi obtido uma vez que o potencial inicial foi o mesmo para todos os experimentos.

A influência do pH sobre o pico de oxidação do estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão Britton-Robinson pH 2,0-12,0 é mostrada na Fig. 7.

Figura 7: Influencia do pH sobre o potencial de oxidação do estriol utilizando tampão Britton-Robinson como eletrólito suporte.



O aumento do pH desloca o potencial de pico de oxidação do estriol para valores menos positivos. Este é um comportamento típico para a oxidação de fenóis e foi também observado por Vega *et al.* (2007) na oxidação de compostos fenólicos estrogênicos.

O ponto de interseção das duas linhas retas observadas na Fig. 7 demarca o pKa do grupo fenólico presente na estrutura química do

estriol. O valor encontrado (10,0) é muito próximo do valor relatado na literatura de 10,3-10,4 (QUINTANA *et al*, 2004).

Como demonstrado, uma boa relação entre o baixo potencial de oxidação, boa definição de pico e alto valor da densidade de corrente foram alcançados utilizando solução de NaOH (pH 12,0) como eletrólito suporte, a qual, portanto, foi escolhida como eletrólito suporte para desenvolvimento posterior da metodologia.

5.1.3 Comportamento eletroquímico do estriol sobre EDDB em NaOH

Os voltamogramas cíclicos na Fig. 8 mostram o comportamento eletroquímico de estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) sobre EDDB. A influência da velocidade sobre o potencial de oxidação do estriol foi estudada numa faixa de 10 - 200 mVs^{-1} . O potencial foi variado de 0,0 - 0,7 V e de volta para 0,0 V.

Os voltamogramas cíclicos são característicos de uma reação eletroquimicamente irreversível mostrando apenas um pico de oxidação num potencial de 0,365 V para a velocidade de 20 mV s^{-1} .

O potencial de pico foi deslocado para valores mais positivos com o incremento da velocidade, e também está de acordo com o comportamento de um sistema eletroquimicamente irreversível. Além disso, uma variação linear foi observada ao plotar o gráfico $j \times v^{1/2}$ (Fig. 9) indicando um processo controlado por difusão.

Figura 8: Voltamogramas cíclicos para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), v (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90, (j) 100, (k) 150 e (l) 200 mV s^{-1} .

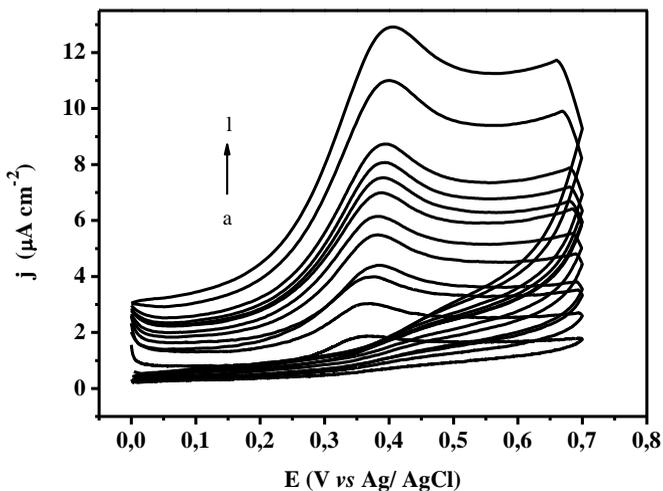
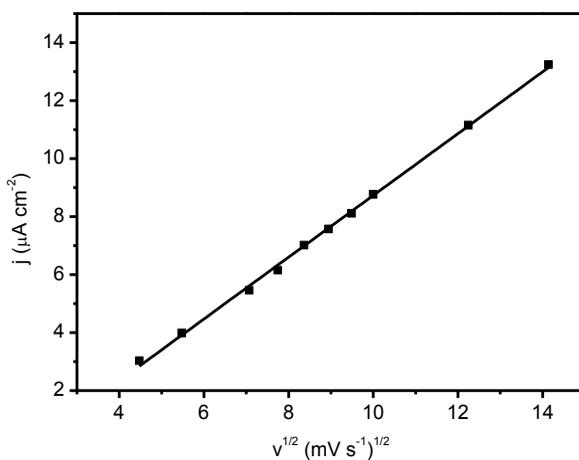
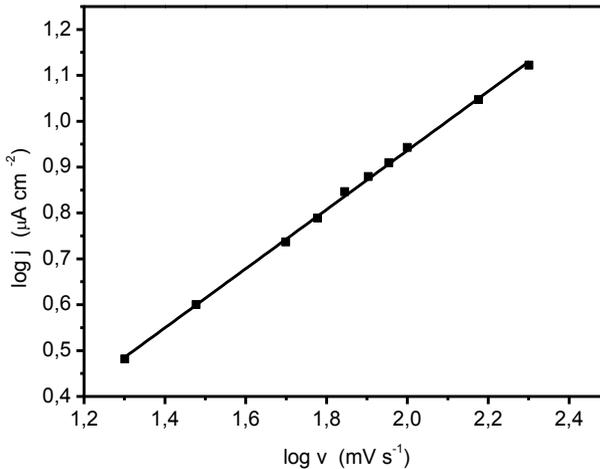


Figura 9: Variação da j com $v^{1/2}$ para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).



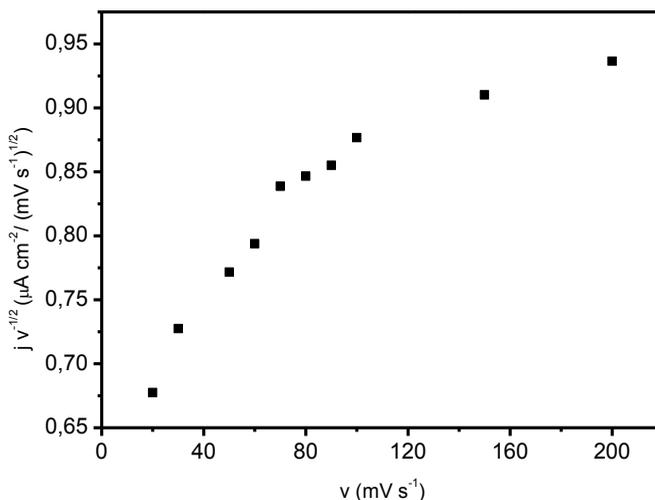
O gráfico $\log j \times \log v$ (Fig. 10) mostrando uma inclinação de 0,64 ($r = 0,999$) confirmou que a reação é controlada por difusão e apresenta uma pequena contribuição do processo de adsorção, visto que para processos controlados apenas por difusão a inclinação deve ser de 0,5.

Figura 10: Variação do $\log j$ com $\log v$ para estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).



Finalmente, a interdependência entre a função corrente ($jv^{-1/2}$) e a velocidade de variação de potencial indicou reação química acoplada ao processo de oxidação, como mostra a Fig. 11.

Figura 11: Variação da função corrente ($jv^{-1/2}$) com v para estriol $2,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} sobre EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (pH 12,0).



Os dados recolhidos sobre a influência do pH da solução e a velocidade de variação de potencial sobre o comportamento eletroquímico do estriol em EDDB permitem algumas especulações a respeito de seu mecanismo de oxidação. O mecanismo para a oxidação eletroquímica do estriol parece seguir a oxidação típica de compostos fenólicos tendo apenas um grupo hidroxila na sua estrutura (GALATO *et al*, 2001; GIACOMELLI *et al*, 2002; GIACOMELLI *et al*, 2004).

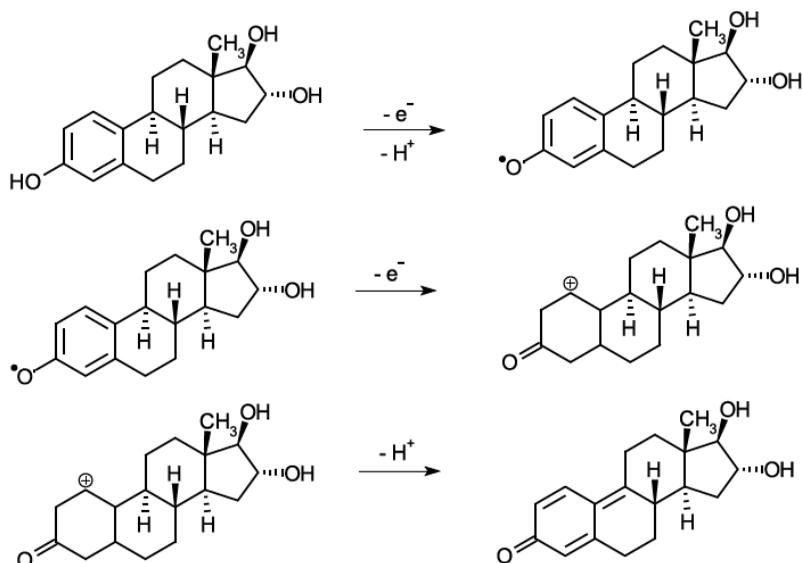
Os voltamogramas cíclicos do estriol (Fig. 8) são semelhantes aos do 17 β -estradiol (NGUNDI *et al*, 2003), um hormônio com estrutura química similar. O comportamento eletroquímico de ambos os hormônios mostra um pico de oxidação e as características de um processo eletroquimicamente irreversível.

Assim, propomos que a oxidação eletroquímica do estriol forma um íon fenóxido (etapa eletroquímica da reação) num processo que envolve a transferência de dois elétrons. Tal reação de oxidação é controlada por difusão, como indicado pelos dados obtidos em diferentes velocidades de variação de potencial.

O íon fenóxido sofre reações químicas na sequência (etapa química do mecanismo de reação). As reações são rápidas, dependentes do pH da solução e irreversíveis em meios alcalinos. Este mecanismo

está também de acordo com o deslocamento de E propiciado pelo aumento de pH. Os produtos resultantes variam de acordo com os rearranjos na molécula oxidada. Em meio contendo acetonitrila, por exemplo, o produto final identificado foi derivado de cetona na oxidação do 17 β -estradiol (NGUNDI *et al*, 2003). A Fig. 12 representa o mecanismo de reação proposto.

Figura 12: Mecanismo de reação proposto para a oxidação eletroquímica do estriol.



A estabilidade do estriol em solução de NaOH (pH 12,0) foi inicialmente analisada durante 6 horas por voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos obtidos ao longo do tempo foram reprodutíveis indicando que a solução de estriol era estável. O mesmo comportamento foi observado para uma solução estudada durante 10 dias. Estes ensaios indicam que a determinação de estriol pode ser realizada em solução de NaOH (pH 12,0) sem modificar a composição da solução que contém o analito.

5.1.4 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada é uma técnica de pulso que oferece a vantagem de apresentar alta velocidade e uma boa sensibilidade para reações reversíveis e irreversíveis.

O sinal é obtido aplicando-se uma série de pulsos sobrepostos sobre o sinal na forma de escada. A corrente é medida duas vezes, no pulso direto e no pulso inverso. O sinal é dado pela diferença entre estas duas correntes.

Como consequência, um passo importante no desenvolvimento da metodologia eletroanalítica é a otimização dos parâmetros que podem influenciar a resposta voltamétrica. Assim, serão otimizados os parâmetros: frequência (f), amplitude (a) e incremento (ΔE_s).

A otimização destes parâmetros foi realizada em estriol $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e, como eletrólito suporte, NaOH $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).

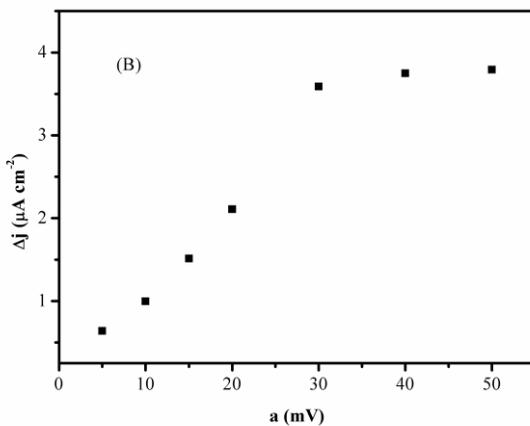
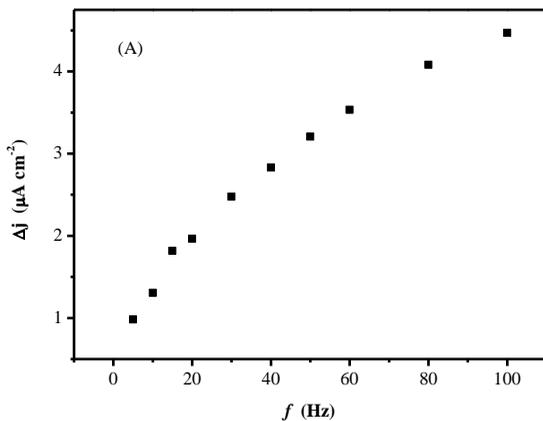
As faixas de frequência estudadas foram 5 - 100 Hz, 10 - 50 mV para amplitude e 1 - 5 mV para incremento.

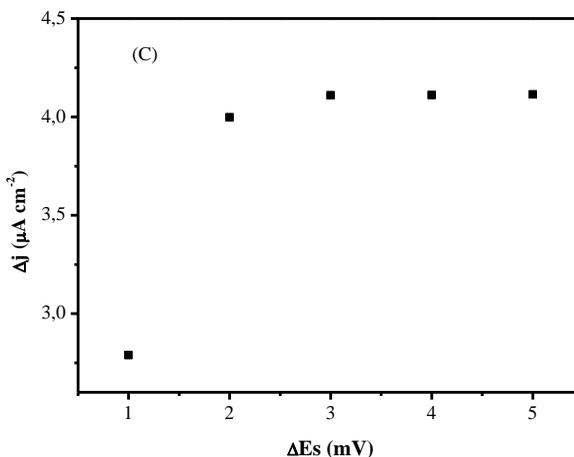
A frequência é um dos parâmetros mais importantes da voltametria de onda quadrada uma vez que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a sensibilidade do método.

A densidade de corrente anódica aumentou com o aumento da frequência com valores de a e ΔE_s constantes, como mostrado na Fig. 13(A). Em frequências mais elevadas, foram observados alargamento e distorção nos voltamogramas (dados não mostrados). Uma excelente relação entre o perfil voltamétrico e sensibilidade foi obtida na frequência de 20 Hz. Como consequência, a frequência de 20 Hz foi escolhida para ser utilizada em experiências posteriores.

Para sistemas irreversíveis, a sensibilidade analítica da voltametria de onda quadrada é muito influenciada por variações na amplitude (SOUZA *et al.*, 2003). Observa-se na Fig. 13(B) que os valores de densidade de corrente aumentaram de forma linear até 30 mV e para valores mais elevados permaneceu praticamente constante. Assim, a amplitude de 30 mV foi selecionada para continuidade dos experimentos.

Figura 13: Dependência da densidade de corrente anódica com (A) frequência em $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV, (B) amplitude em $f = 60$ Hz e $\Delta E_s = 2$ mV e (C) incremento em $a = 40$ mV e $f = 60$ Hz obtido por voltametria de onda quadrada para estriol $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em EDDB imerso em NaOH (pH 12,0).





A velocidade de variação do potencial é o resultado do produto de f e ΔE_s . Portanto, um ΔE_s mais alto pode aumentar o sinal analítico e, assim, melhorar a sensibilidade do método (SOUZA *et al.*, 2003). No entanto, com incrementos superiores pode ocorrer um alargamento do pico, e, assim, a resolução dos voltamogramas pode ser afetada. Consequentemente, este é um parâmetro que também tem de ser analisado. Na Fig. 13, pode ser visto que a densidade de corrente anódica permaneceu praticamente constante para valores ΔE_s superiores a 2 mV e, por conseguinte, este valor foi selecionado.

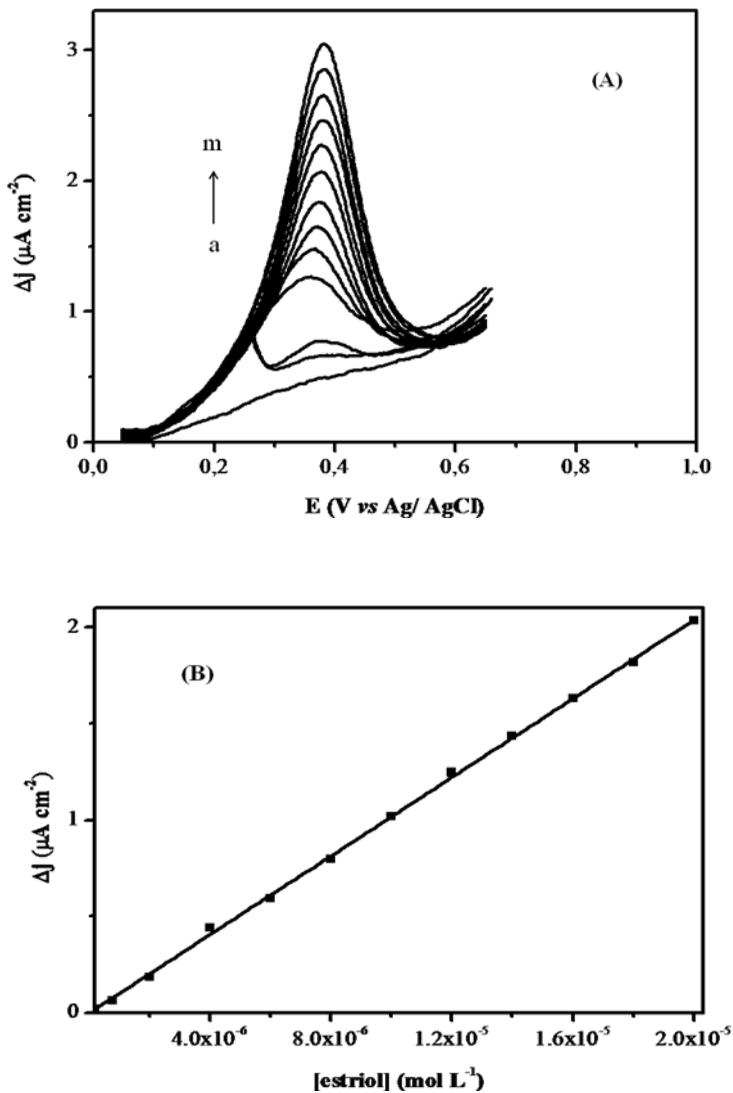
Os valores dos parâmetros otimizados também foram utilizados para validar a metodologia proposta, bem como para a determinação de estriol em um produto farmacêutico e em urina.

5.1.5 Curva de calibração e parâmetros de validação do método proposto para determinação de estriol

Os parâmetros previamente otimizados da VOQ foram empregados para construir a curva de calibração para o estriol em solução de NaOH (pH 12,0) como eletrólito suporte, utilizando o EDDB.

Os voltamogramas de onda quadrada foram coletados de 0,0 a 0,7 V e a densidade de corrente anódica resultante foi registrada no potencial de pico. A Fig. 14.A mostra a voltametria de onda quadrada para o estriol obtido após adições sucessivas da respectiva solução-estoque e 16.B mostra a curva de calibração correspondente.

Figura 14: (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos após adições sucessivas de estriol, (B) curva de calibração construída a partir desses voltamogramas.



Para a construção da curva de calibração, as correntes mostradas nos voltamogramas de onda quadrada foram subtraídas da corrente de fundo. A Tabela 4 mostra alguns dos parâmetros de validação do método proposto para a determinação do estriol.

Tabela 4: Parâmetros extraídos dos voltamogramas de onda quadrada e da curva de calibração.

Parâmetro	Valor
Potencial de pico (V)	0,38
Faixa linear (mol L ⁻¹)	2,0 x 10 ⁻⁷ a 2,0 x 10 ⁻⁵
Coefficiente de correlação	0,9994
Inclinação (µA L mol ⁻¹) (x 10 ⁵)	1,02
Desvio padrão da curva (µA L mol ⁻¹ cm ⁻²) (x 10 ²)	7,73
Intercepto (µA cm ⁻²)	-0,0044
Desvio padrão do intercepto (µA cm ⁻²)	0,0088
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	1,72 x 10 ⁻⁷
Limite de quantificação (mol L ⁻¹)	7,98 x 10 ⁻⁷
Repetibilidade da corrente de pico (%) ^{a,b}	0,64
Repetibilidade da corrente de pico (interdia) (%) ^{a,b}	0,98
Repetibilidade da corrente de pico (intradia) (%) ^{a,b}	0,78
Repetibilidade do potencial de pico (%) ^{a,b}	1,05
Repetibilidade do potencial de pico (interdia) (%) ^{a,b}	1,58
Repetibilidade do potencial de pico (intradia) (%) ^{a,b}	1,23

^a Desvio padrão relativo, ^b n = 3

Como podemos observar, a oxidação do estriol produziu um pico no potencial de 0,38 V e o aumento da densidade de corrente foi proporcional à concentração de estriol adicionado na célula analítica.

A curva de calibração apresenta uma resposta linear na faixa de 2,0 x 10⁻⁷ a 2,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. A equação linear pode ser expressa de acordo com a $\Delta j / \mu A cm^{-2} = 1,02 \times 10^5 [\text{estriol}] / \text{mol L}^{-1} - 0,0044$.

A partir destes parâmetros, o limite de detecção (LD) foi calculado de acordo com a equação: LD = 3 s / S, onde s é o desvio padrão da coordenada y (coeficiente linear) e S a inclinação (angular coeficiente) do ajuste linear. O LD calculado para o estriol foi 1,72 x 10⁻⁷ mol L⁻¹. Além disso, o limite de quantificação (LQ) foi calculado utilizando a equação: LQ = 10 s / S. O LQ calculado para o estriol foi de 7,98 x 10⁻⁷ mol L⁻¹.

A repetibilidade de cinco medições da corrente de pico para as soluções de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de estriol, em condições otimizadas, apresentou desvio padrão relativo de 0,64%. A repetibilidade da corrente de pico foi testada utilizando duas metodologias: interdias, ao longo de 5 dias, utilizando diferentes soluções preparadas na concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e intradia, utilizando cinco diferentes soluções preparadas no mesmo dia e utilizando a mesma concentração de estriol ($5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). Os desvios padrões relativos (n = 5) foram 0,98 e 0,78%, respectivamente. Bons resultados também foram obtidos para a repetibilidade do potencial de pico, como observado na Tabela 4.

Estes resultados demonstram que o método proposto mostra excelente precisão, repetibilidade e sensibilidade para a determinação de estriol.

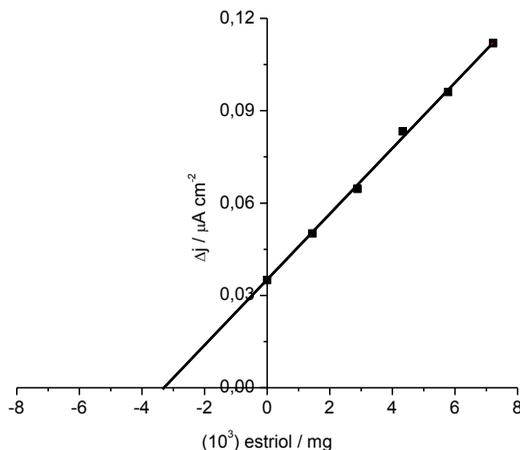
5.1.6 Determinação de estriol em um produto comercial farmacêutico

A metodologia eletroanalítica descrita anteriormente e o método padrão de radioimunoensaio para a determinação de estriol foram aplicados na determinação deste hormônio em uma formulação farmacêutica comercial.

A determinação eletroanalítica é mostrada na Fig. 15. Os valores médios para as três determinações (n = 3) de ambas as técnicas foram muito próximos ao valor declarado de 1,00 mg. Os limites de confiança foram calculados para um nível de significância de 0,05.

Os valores de concentração foram convertidos em unidade de massa (mg) para posterior comparação com o valor rotulado pelo fabricante.

Figura 15: Curva de determinação eletroanalítica de estriol em formulação farmacêutica utilizando a metodologia proposta.



A Tabela 5 resume os resultados obtidos. O método oficial resultou num valor mais elevado para a determinação do valor de estriol rotulado no produto comercial farmacêutico, enquanto o método eletroanalítico resultou em valores mais baixos.

Tabela 5: Resultados obtidos na determinação de estriol em formulação farmacêutica usando a metodologia proposta e do método oficial.

	Radioimunoensaio	Eletroanalítico
Encontrado (mg) ^{a*}	1,03	0,96
D.P.R. (%)	6,26	1,20
Er (%) ^b	-	-6,79
t_{valor}^c	-	5,5
F_{valor}^d	3,1	3,1

^a n = 3

^b Er = erro relativo entre os métodos eletroanalítico e radioimunoensaio

^c $t_{\text{teórico}} = 5,99$

^d $F_{\text{teórico}} = 19$

* valor rotulado = 1 mg

O erro relativo entre o método proposto e o radioimunoensaio foi -6,79%.

O desempenho dos dois métodos (proposto e padrão) foi verificado utilizando-se os testes t-Student e F.

O teste t-Student foi realizado para verificar a validade dos dados obtidos pelos métodos padrão e proposto. No nível de confiança de 95% para ambos os resultados o t_{valor} calculado foi menor do que o resultado do $t_{\text{teórico}}$ (5,99), indicando que não houve diferença significativa entre os dados obtidos utilizando os dois métodos e o valor rotulado.

A precisão do método proposto foi comparada ao do método padrão através do teste estatístico dos valores obtidos a partir do teste F, também em nível de confiança de 95%. O F_{valor} foi 3,1, e é menor que o $F_{\text{teórico}}$ (19), indicando desempenho excelente do método eletroanalítico quando comparado ao método padrão.

5.1.7 Estudos de interferentes e recuperação na determinação de estriol em um produto comercial farmacêutico

Tendo em vista que os outros componentes de matriz da dosagem farmacêutica podem interferir na quantificação do estriol os efeitos potenciais dos componentes da matriz foram investigados.

Estearato de magnésio, amido, lactose e amilopectina (os excipientes presentes na preparação farmacêutica utilizada neste estudo) foram testados como interferentes potenciais. Estudos preliminares mostraram que todos eles são insolúveis em metanol (solvente utilizado para preparar as soluções).

Nos testes de determinação de estriol realizados na presença destes interferentes potenciais não foi observada diferença significativa dos resultados descritos acima.

Os testes de recuperação foram realizados na presença da amostra real (método da adição de padrão). A faixa aceitável de recuperação para análise nesta ordem de concentração está geralmente compreendida entre 80 e 120% (RIBANI *et al*, 2004).

Como demonstrado na Tabela 6, a recuperação de estriol variou de 100 – 102%. Além disso, a inclinação da reta $1,09 \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ($r = 0,9982$), obtida a partir da curva representada na Fig. 15, é muito próxima do valor obtido a partir da curva de calibração (Tabela 4), que indica a excelente seletividade do método proposto.

Tabela 6: Estudos de recuperação do estriol em formulação farmacêutica comercial.

Amostras	Adicionado ^a	Encontrado	Recuperado (%)
Produto farmacêutico (mol L ⁻¹)	9,00 x 10 ⁻⁷	8,97 x 10 ⁻⁷	100
	1,00 x 10 ⁻⁶	1,01 x 10 ⁻⁶	101
	2,00 x 10 ⁻⁶	2,05 x 10 ⁻⁶	102
	3,00 x 10 ⁻⁶	3,03 x 10 ⁻⁶	101
	4,00 x 10 ⁻⁶	4,07 x 10 ⁻⁶	102

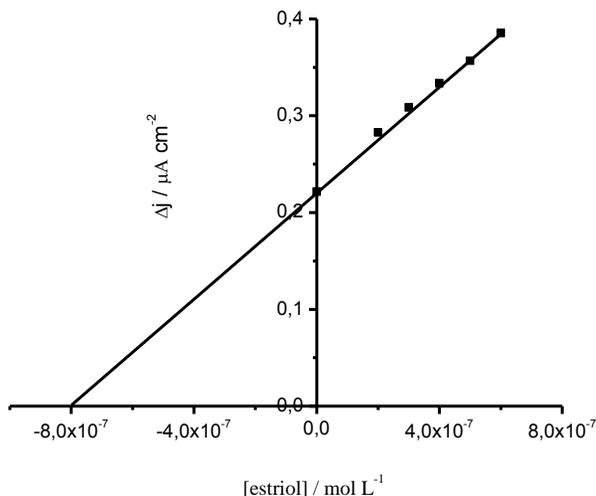
^an = 3

Estes resultados mostraram que o método proposto pode ser aplicado com sucesso aos ensaios de determinação de estriol na forma de comprimido, sem qualquer interferência significativa de efeitos de matriz.

5.1.8 Determinação de estriol em urina de gestante e estudos de recuperação

Sem qualquer preparação da amostra, extração, filtração e/ou evaporação, além de uma diluição adequada da amostra, a metodologia eletroanalítica desenvolvida foi aplicada com sucesso para a determinação do estriol numa amostra de urina colhida de uma mulher em seu terceiro trimestre de gravidez (Fig. 16).

Figura 16: Curva de determinação eletroanalítica de estriol em urina de gestante utilizando a metodologia proposta.



A Tabela 7 resume os resultados obtidos e a comparação entre os métodos através do desvio padrão relativo, erro relativo e teste estatístico F.

Tabela 7: Determinação de estriol em amostra de urina de gestante

Método	Radioimunoensaio	Eletroanalítico
Encontrado (mol L ⁻¹) ^a	8,43 x 10 ⁻⁵	8,03 x 10 ⁻⁵
D.P.R. (%)	1,37	1,44
Er (%) ^b	-	-4,74
F _{valor} ^c	1,00	1,00

^a n = 3

^b Er = erro relativo entre os métodos eletroanalítico e radioimunoensaio

^c F_{teórico} = 19

Observa-se que o valor encontrado para a determinação de estriol em urina ($8,03 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, n = 3) foi mais baixo do que o valor encontrado pelo método comparativo de radioimunoensaio ($8,43 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Ambos os valores encontrados estão de acordo com os valores publicados em literatura pertinente (REYES-ROMERO, 2001). Este valor foi recalculado considerando-se que a amostra sofre diluição

ao ser adicionada a cela eletroquímica de 25 mL. Foram adicionados 250 μL de urina.

O erro relativo para a média de três determinações foi de 4,74% considerando os métodos eletroanalítico e o radioimunoensaio. A precisão do método proposto foi comparada com o método oficial por meio de análise estatística dos valores obtidos a partir do teste F, considerando um nível de confiança de 95% (Tabela 8). O F_{valor} (1,0) foi menor do que o $F_{\text{teórico}}$ (19,0), indicando excelente desempenho do método eletroanalítico usando o eletrodo EDDB quando comparado com o método de radioimunoensaio.

Experimentos de recuperação foram realizados na presença da matriz real, a fim de verificar os efeitos de interferência. Como demonstrado na Tabela 8, a recuperação do estriol variou de 100 - 103%, indicando que a composição da matriz não interfere significativamente na resposta analítica do método proposto. A seletividade do método proposto foi confirmada comparando as inclinações da curva de calibração (Tabela 5) e a obtida na Fig. 16 ($1,04 \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$, $r = 0,9991$), os valores são próximos.

Tabela 8: Estudos de recuperação do estriol em amostra de urina de gestante

Amostras	Adicionado ^a	Encontrado	Recuperado (%)
Urina de gestante (mol L^{-1})	$8,00 \times 10^{-7}$	$8,05 \times 10^{-7}$	101
	$9,00 \times 10^{-7}$	$9,04 \times 10^{-7}$	100
	$1,00 \times 10^{-6}$	$1,03 \times 10^{-6}$	103

^an = 3

5.1.9 Estudo de interferentes potenciais para a determinação de estriol em urina

É sabido que a urina é uma matriz complexa e a determinação dos seus componentes não é uma tarefa fácil. A urina é composta essencialmente por água, sais minerais, proteínas, ácido úrico e principalmente albumina e creatinina. Durante a gravidez, também é comum que a glicose e as concentrações de progesterona aumentem.

Esses compostos podem dificultar a determinação eletroquímica de estriol, por isso os estudos sobre interferentes foram realizados para identificar tal influência.

Os principais componentes da urina (progesterona, uréia, ácido úrico, creatinina e albumina) foram testados como interferentes em estriol $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. As proporções de estriol:interferente estudadas foram de: 1:0,01, 1:0,1, 1:1, 1:10 e 1:100. Os resultados para a determinação da densidade de corrente anódica obtida a partir dos voltamogramas registrados para oxidação do estriol na ausência e na presença de interferentes potenciais estão listados na Tabela 9. Como podemos observar, a densidade de corrente gerada pela oxidação do estriol foi quase a mesma na ausência e na presença dos interferentes. O teste t aplicado mostrou que as diferenças de corrente produzidas não são significativas, portanto, a progesterona, uréia, ácido úrico, albumina e creatinina não interferem no sinal analítico produzido pela oxidação eletroquímica do estriol.

Assim, podemos extrapolar essa observação para uma amostra de urina real e considerar que os componentes da urina não interferem significativamente na determinação do estriol em amostras de urina durante a gravidez.

Tabela 9: Estudo dos interferentes na determinação de estriol em urina

	Proporção estriol:interferente					
	(1:0)	(1:0.01)	(1:0.1)	(1:1)	(1:10)	(1:100)
	Densidades de corrente anódica ($\mu\text{A cm}^{-2}$) ^a					
Uréia	0,15	0,15	0,13	0,16	0,15	0,16
Ácido Úrico	0,15	0,16	0,15	0,16	0,15	0,14
Creatinina	0,14	0,14	0,13	0,14	0,14	0,15
Albumina	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,17

^a n = 3

A linearidade e a inclinação da curva de calibração e a obtida pelo método de adição de padrão, a repetibilidade dos dados e dos resultados de recuperação obtidos para a determinação do estriol usando os parâmetros otimizados para VOQ e um pré-tratamento de superfície apropriado para o EDDB indicaram que a metodologia eletroanalítica proposta pode ser aplicada com sucesso em processos de controle de estriol em amostras de urina durante a gravidez.

A determinação direta do estriol na urina aqui relatada é comparável à metodologia existente de radioimunoensaio, mas com vantagens evidentes, por não necessitar de nenhuma etapa de separação ou de pré-tratamento da matriz.

5.2 ESTUDOS REFERENTES AO HORMÔNIO ESTRONA

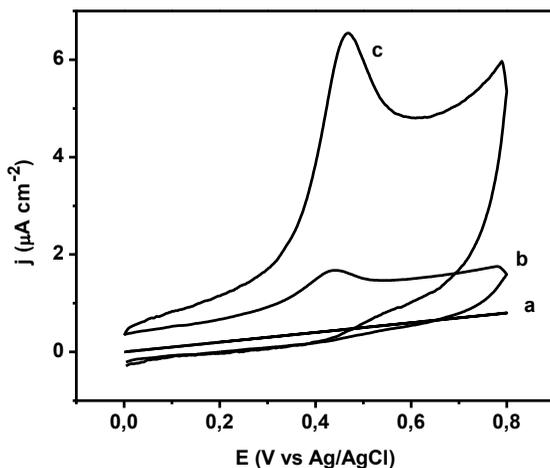
5.2.1 Escolha do eletrodo

Foram usados os eletrodos de cobre, platina, ouro, carbono vítreo e diamante dopado com boro para testes iniciais visando a comparação da oxidação eletroquímica da estrona.

As medições de voltametria cíclica foram realizadas aplicando-se potencial na faixa de 0,0 - 0,8 V numa velocidade de 100 mV s^{-1} em estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ tendo como eletrólito suporte NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 12,0.

Similar ao observado no processo de oxidação do estriol, a estrona apresentou-se eletroquimicamente inativa sobre eletrodos de platina, cobre e ouro, uma vez que nenhuma oxidação foi observada. No entanto, nos voltamogramas (Fig. 17) produzidos com o carbono vítreo e o EDDB.

Figura 17: Voltamogramas obtidos utilizando o EDDB (c) e carbono vítreo (b) na presença de estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e na ausência para ambos os eletrodos (a).



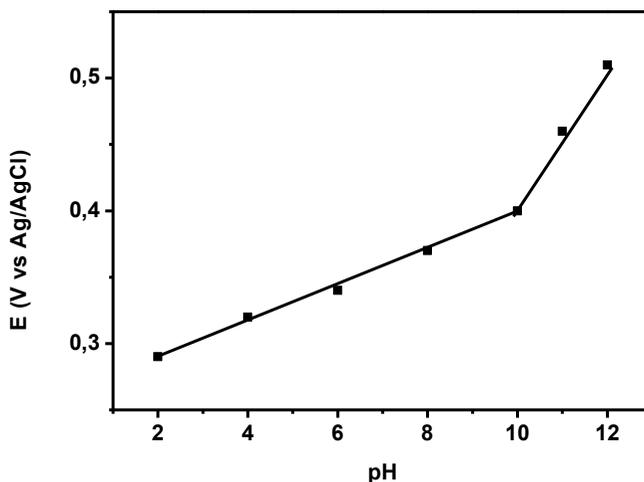
Observa-se que a oxidação eletroquímica da estrona produziu um pico bem definido de corrente anódica, sendo que a corrente no

EDDB foi quase 10 vezes maior do que a do eletrodo de carbono vítreo. Portanto, o eletrodo EDDB foi selecionado para desenvolver a metodologia para a determinação eletroquímica de estrona.

5.2.2 Escolha do pH e do eletrólito suporte

A influência do pH sobre o pico de oxidação da estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão Britton-Robinson com soluções variando de pH 2,0 - 12,0 é mostrada na Fig. 18.

Figura 18: Influencia do pH no potencial de oxidação da estrona utilizando tampão Britton–Robinson como eletrólito suporte.



Observa-se que houve deslocamento do potencial para valores mais positivos com o aumento do pH que também resultou numa maior corrente de oxidação anódica.

Isso pode ser explicado pela presença do grupo cetona ($=O$). A oxidação da molécula ocorre no grupamento fenólico, porém a presença na mesma molécula deste grupamento ($=O$) faz com que seja dificultada a oxidação, levando para valores mais positivos o potencial em que acontece a oxidação.

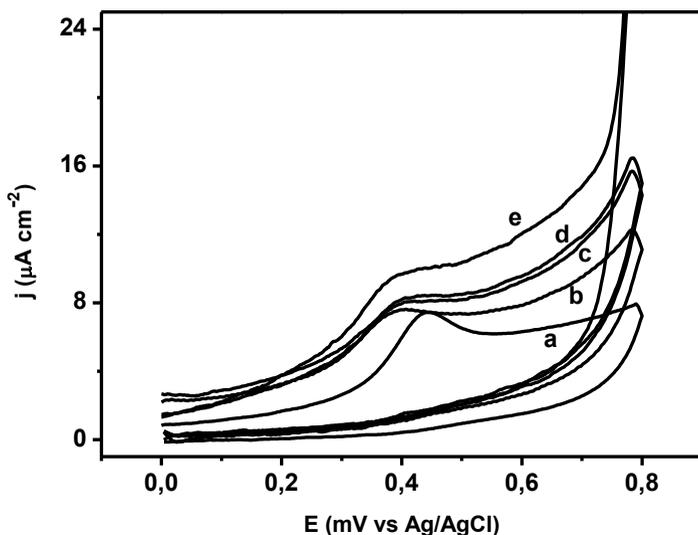
Comportamento similar foi observado por Fornazari (2009) na oxidação eletroquímica por eletrólise galvanostática de soluções de

misturas de fenol e formaldeído. Para uma solução composta por $4,25 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ de fenol e $6,7 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ de formaldeído, com pH variando de 3 a 12, o potencial de oxidação na célula eletroquímica foi de 11,15 a 12,75 V, respectivamente, quando aplicada uma densidade de corrente de 40 mA cm^{-2} .

O ponto de intersecção das duas linhas retas observadas na Fig. 18 demarca o pKa do grupo fenólico presente na estrutura química da estrona. O valor encontrado (10,0) é muito próximo do valor relatado na literatura de 10,5 (QUINTANA *et al.*, 2004).

Para um refinamento do sinal e a fim de observar que composição de solução era mais adequada, foram testados como eletrólito suporte os tampões Britton–Robinson e Ringer e soluções de NaOH, LiOH e KOH com concentração inicial de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (todas com pH ajustado para 12) para investigar a oxidação da estrona em um eletrodo EDDB. A Figura 19 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para estrona em diferentes eletrólitos suporte.

Figura 19: Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) da estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes soluções e pH 12,0 usando EDDB (a) NaOH ; (b) LiOH ; (c) Britton–Robinson ; (d) KOH; (e) Tampão Ringer.



Em todos os voltamogramas, apenas um pico de oxidação foi observado quando o potencial foi variado de 0,0-0,8 V e de volta para 0,0V a uma velocidade de variação de 100 mVs^{-1} .

Como podemos perceber, a oxidação da estrona em solução de LiOH, tampão Britton–Robinson e solução KOH (Fig. 19 (a, b, c)) acontece a um potencial de 0,40 V (sendo em solução de LiOH um pouco deslocado para 0,39 V) e foi observado um pico de oxidação definido, porém com baixa densidade de corrente anódica.

Em tampão Ringer (Fig. 19(e)), a oxidação da estrona foi deslocada para valor menos positivo, 0,37 V, com uma pequena densidade de corrente produzida e alargamento do pico de oxidação.

Por fim, o pico de oxidação mais bem definido e com mais alta densidade de corrente anódica foi obtido em NaOH (Fig. 19(a)), apresentando potencial de oxidação de 0,48 V. Sendo assim, por demonstrar uma boa relação entre definição e alto valor da densidade de corrente foi escolhida a solução de NaOH (pH 12,0) como eletrólito suporte para posterior desenvolvimento da metodologia eletroanalítica.

5.2.3 Tempo de limpeza do eletrodo

A limpeza do eletrodo de trabalho consiste numa etapa importante do desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas.

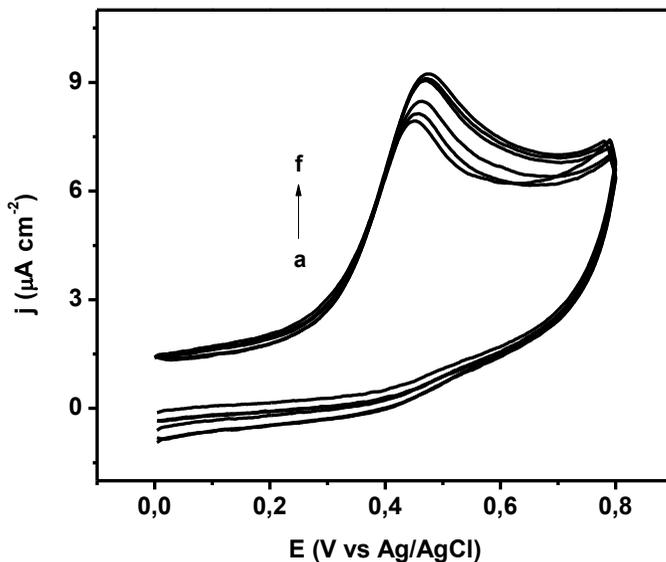
A cada medida é importante repetir a superfície do eletrodo em condições idênticas a fim de se obter dados mais reprodutíveis.

O acúmulo de moléculas na superfície do eletrodo de trabalho pode resultar em dois problemas: bloqueio do sinal analítico pois a presença de moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo impedem a oxidação e/ou redução de novas moléculas, e ainda, mascaramento do sinal analítico verdadeiro pela diminuição ou aumento do sinal.

O tipo de limpeza escolhido para desenvolvimento da metodologia para determinação de estrona foi o eletroquímico. Na própria célula de determinação foi utilizado o mesmo potencial de polarização (-3,0 V) proposto para ativação do EDDDB para a determinação de estriol. O tempo de polarização foi então investigado a fim de otimizar a resposta produzida por esse eletrodo.

A Figura 20 apresenta os voltamogramas cíclicos de oxidação da estrona após o tempo de limpeza que variou de 10 a 50 s.

Figura 20: Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) com estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodo EDDB imerso em soluções de NaOH $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes tempos de limpeza (a) 10; (b) 15; (c) 20; (d) 30; (e) 40 e (f) 50 s.



É possível observar um leve deslocamento do potencial de oxidação da estrona para valores mais positivos a medida que se aumenta o tempo de limpeza do eletrodo EDDB. Salazar-Banda *et al.* (2006) observaram comportamento semelhante ao investigar o comportamento eletroquímico do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$.

Os tempos de limpeza de 10 a 20 s (Fig. (a,b,c)) apresentaram os menores valores de corrente e potenciais um pouco mais positivos. A partir do tempo de limpeza de 40 s não houve alteração significativa do valor da densidade de corrente, portanto o tempo de 40 s foi escolhido para a continuação dos experimentos.

5.2.4 Concentração do eletrólito suporte

O eletrólito suporte é uma solução de substância iônica cuja concentração costuma ser tipicamente entre 10 a 100 vezes maior que as demais espécies na cela eletroquímica. O eletrólito suporte deve ser

eletroinativo na janela de potencial do eletrodo na qual os estudos com o analito de interesse são realizados. Além disso, o eletrólito suporte deve ser inerte, não reagindo com o analito eletroativo ou nenhum de seus subprodutos.

As funções principais do eletrólito suporte são, primeiramente, ser responsável por quase a totalidade da corrente iônica da cela, uma vez que ele está em grande excesso em relação às demais substâncias em solução. A alta concentração do eletrólito suporte mantém baixa a resistência da cela. Em segundo lugar, o eletrólito suporte mantém a força iônica da solução constante, impedindo que a composição da interface entre a solução e o eletrodo mude significativamente com a corrente proveniente da reação.

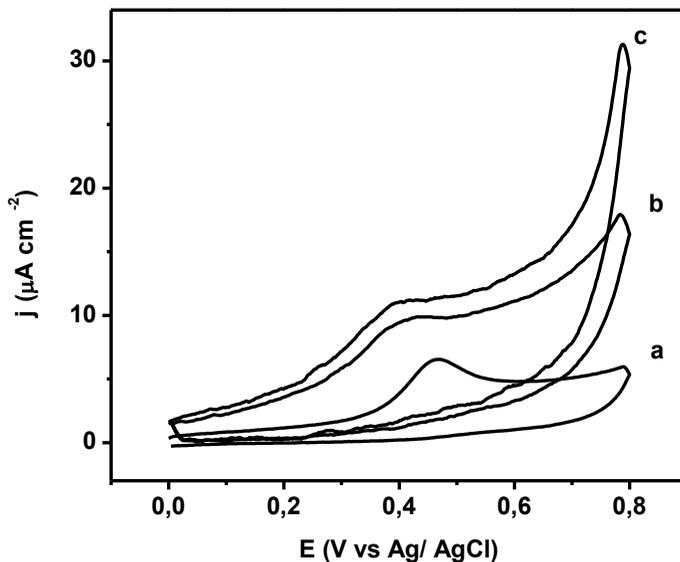
Finalmente, o eletrólito suporte suprime a contribuição da corrente de migração (formação de um gradiente de carga elétrica) no transporte do analito para a superfície do eletrodo.

Foram estudadas três concentrações diferentes ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) de solução de NaOH (pH 12,0) em estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

As proporções, portanto, entre a concentração do analito e o eletrólito suporte eram de 1:100, 1:1000, 1:2000.

Pelos perfis voltamétricos apresentados na Fig. 21, é possível perceber que para concentrações onde a proporção é maior que 1:1000, as concentrações $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ produziram sinal pouco definido e de baixa densidade de corrente anódica. Portanto, a concentração escolhida para sequência de otimizações e desenvolvimento da metodologia eletroanalítica para determinação de estrona foi $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 21: Voltamogramas cíclicos ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) da estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações do eletrólito suporte NaOH (pH 12,0) (a) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (b) $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (c) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando EDDB.

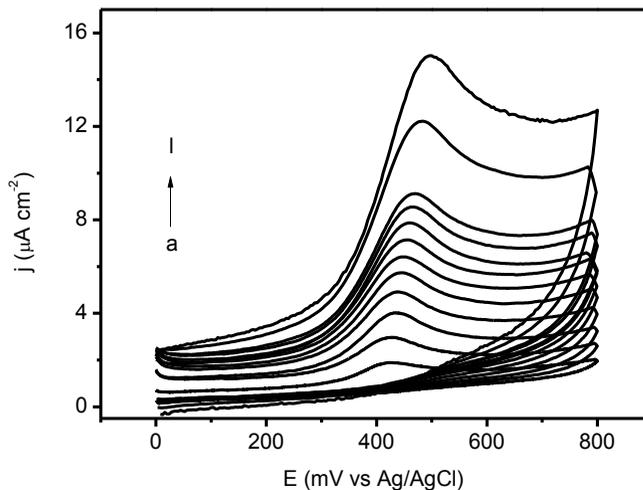


5.2.5 Comportamento eletroquímico da estrona sobre EDDB em NaOH

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Fig. 22 mostram o comportamento eletroquímico de estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) sobre EDDB. A influência da velocidade sobre o potencial de oxidação da estrona foi estudada numa faixa de 10 - 200 mV s^{-1} . O potencial foi variado de 0,0 - 0,8 V e de volta para 0,0 V.

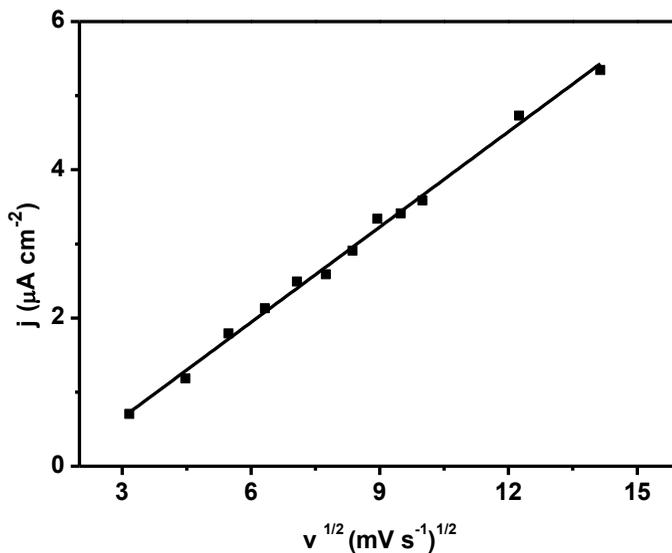
Os voltamogramas cíclicos são característicos de uma reação eletroquimicamente irreversível mostrando apenas um pico de oxidação num potencial de 0,48 V para uma velocidade de 200 mV s^{-1} .

Figura 22: Voltamogramas cíclicos para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodo EDDDB imerso em solução de NaOH (pH 12), v (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90, (j) 100, (k) 150 e (l) 200 mV s^{-1} .



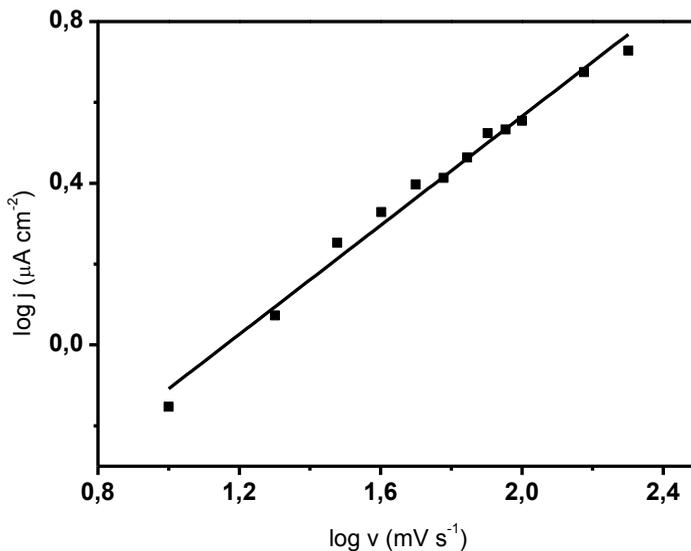
O potencial de pico deslocado para valores mais positivos com o incremento da velocidade, também está de acordo com o comportamento de um sistema eletroquimicamente irreversível. Além disso, uma variação linear foi observada ao plotar o gráfico $j \times v^{1/2}$, com $r = 0,9954$ (Fig. 23) indicando um processo controlado por difusão da reação de oxidação.

Figura 23: Variação da j com $v^{1/2}$ para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).



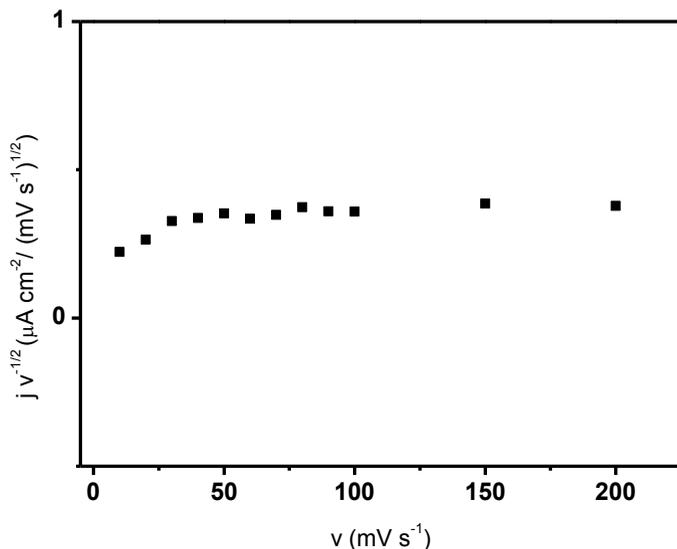
O gráfico $\log j \times \log v$ (Fig. 24) mostrando uma inclinação de 0,67 ($r = 0,9937$), semelhante ao observado para o hormônio estriol, também confirmou que a reação é controlada por difusão e apresenta uma pequena contribuição do processo de adsorção.

Figura 24: Variação de $\log j$ com $\log v$ para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo EDDB imerso em $\text{NaOH } 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).



Avaliando-se também o gráfico da função corrente ($jv^{-1/2}$) versus a variação de velocidade (Fig. 25), observa-se que a interdependência entre esses parâmetros indica que não há reação química acoplada ao processo de oxidação.

Figura 25: Variação da função corrente ($jv^{-1/2}$) com v para estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo EDDB imerso em NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0).



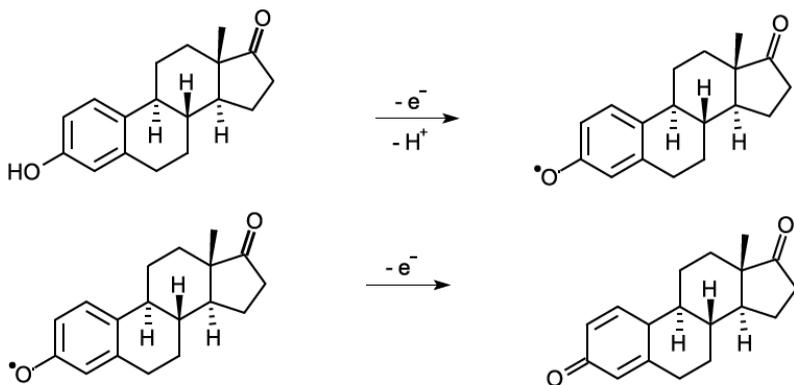
A semelhança entre os dados encontrados tanto para o estriol quanto para a estrona está relacionada com a estrutura das moléculas. Ambos são hormônios estrógenos derivados do colesterol, logo possuem anel fenólico, e o grupamento hidroxila que sofre oxidação está igualmente posicionado em ambas as moléculas.

Acreditamos, no entanto, que a presença de ligação dupla com oxigênio presente na molécula da estrona pode contribuir com o deslocamento de potencial para valores mais positivos de oxidação apresentado por essa molécula.

Um mecanismo de oxidação da estrona é proposto por Pereira (2011). A reação de oxidação eletroquímica, como não envolve etapa química, acontece apenas com a formação do íon fenóxido num processo que envolve a transferência de dois elétrons. Tal reação de oxidação é controlada por difusão, como indicado pelos dados obtidos em diferentes velocidades de variação de potencial.

A Fig. 26 representa o mecanismo de reação proposto.

Figura 26: Mecanismo de reação proposto para a oxidação eletroquímica da estrona.



Com objetivo de verificar a estabilidade do analito em solução de NaOH (pH 12,0), utilizando a voltametria cíclica, realizou-se estudo de uma solução de estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ durante 6 horas. Os voltamogramas cíclicos obtidos ao longo do tempo foram reprodutíveis indicando que a solução de estrona era estável. O mesmo comportamento foi observado para uma solução estudada durante 10 dias. Tais experiências indicam que a determinação de estrona pode ser realizada em solução de NaOH (pH 12,0) sem modificar a composição da solução que contém o analito.

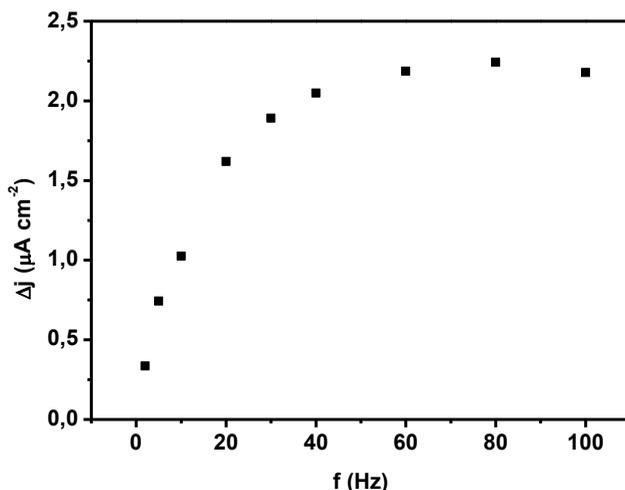
5.2.6 Otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada

Dos parâmetros instrumentais que podem influenciar significativamente na resposta voltamétrica destacam-se a frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) e a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (a). Assim, visando melhorar a resposta voltamétrica relativa ao sinal de oxidação, estes parâmetros foram avaliados nos seguintes intervalos: f de 5 a 100 Hz, a de 5 a 50 mV e ΔE_s de 1 a 5 mV, após análise eletroanalítica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio contendo NaOH $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em todos os casos a escolha da melhor condição de trabalho em termos da análise destes parâmetros foi realizada levando-se em consideração o valor que apresentasse melhora significativa na

intensidade do sinal analítico sem comprometer a resolução voltamétrica.

O primeiro parâmetro investigado foi a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f). Portanto, para este estudo, variou-se a f no intervalo de 5 a 100 Hz, mantendo-se constantes os demais parâmetros, ou seja, ΔE_s 4 mV e a 25 mV. Conforme se observa na Fig. 27, a Δj é significativa e influenciada pelo aumento da f somente para valores entre 5 e 60 Hz, a partir de 60 Hz o valor de Δj permanece constante. Assim, um valor de frequência de 60 Hz foi escolhido como sendo ideal para estudos visando análise quantitativa.

Figura 27: Influência da variação da f sobre os valores de Δj para oxidação eletroquímica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do EDDB em NaOH.

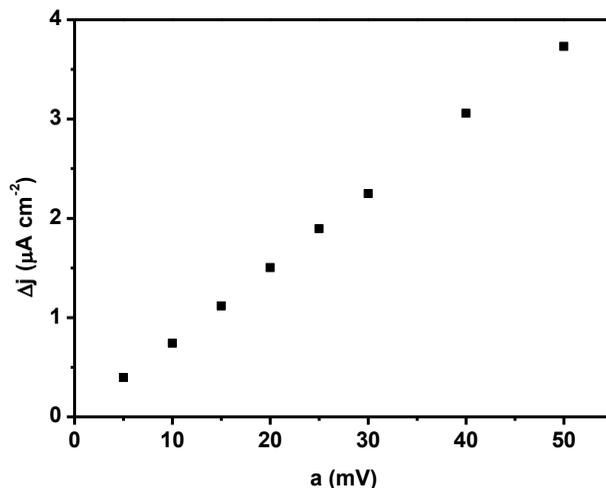


Em seguida, a influência da amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (a) foi avaliada sobre a intensidade da Δj , mantendo-se $f = 60 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. A Fig. 28 descreve o efeito da variação da a no intervalo de 5 a 50 mV para oxidação eletroquímica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sob a mesma condição anteriormente citada.

Como pode ser observado, Δj aumenta com o aumento da a em todos os valores até 50 mV. O perfil voltamétrico das curvas produzidas

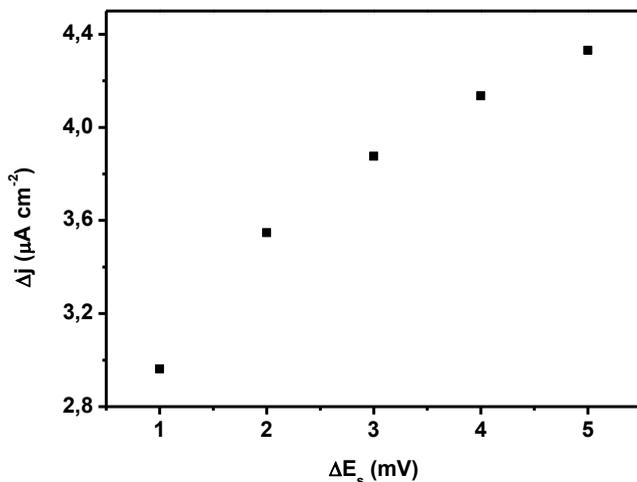
com valores de 50 mV foi satisfatório. Assim sendo, o valor de a de 50 mV foi escolhido para prosseguir com os estudos.

Figura 28: Influência da variação da a sobre os valores de Δj para oxidação eletroquímica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do EDDB em NaOH.



Finalmente, foi realizada a otimização do incremento de varredura de potencial (ΔE_s) empregando-se $f = 60 \text{ Hz}$ e $a = 50 \text{ mV}$, previamente otimizados. Analisando o comportamento da Δj (Fig. 28) após variação do ΔE_s de 1 a 5 mV, verifica-se um aumento significativo em todo intervalo estudado. Porém, em valores de ΔE_s acima de 4 mV, o perfil voltamétrico foi prejudicado por um alargamento do pico, então o valor de $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ foi adotado como sendo ideal para estudos visando propósitos analíticos.

Figura 29: Influência da variação da ΔE_s sobre os valores de Δj para oxidação eletroquímica de estrona $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do EDDB em NaOH.



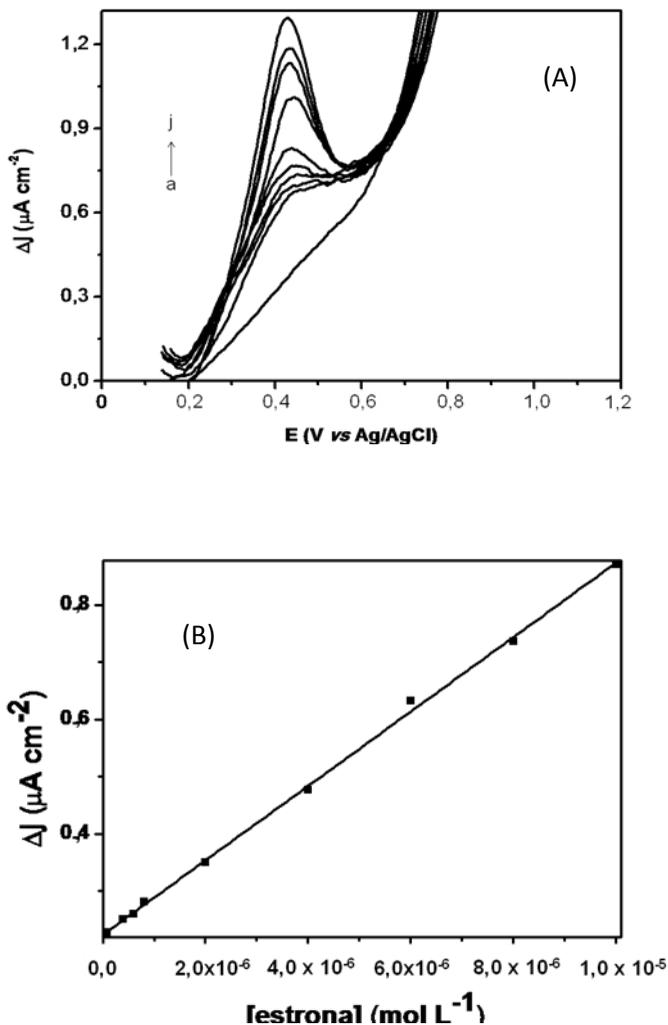
Os valores dos parâmetros otimizados foram utilizados para validar a metodologia proposta, bem como para a determinação de estrona em amostras de leite, manteiga e nata.

5.2.7 Curva de calibração e parâmetros de validação do método proposto para determinação de estrona

Usando a melhor condição de trabalho previamente otimizada, estudos foram realizados em diferentes concentrações de estrona, monitorando-se o sinal de oxidação eletroquímica.

A Figura 30A apresenta os voltamogramas de onda quadrada registrados em diferentes concentrações ($4,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) de estrona. A partir dos valores de Δj obtidos nos voltamogramas (Figura 30 A), a curva de calibração foi construída. Uma relação linear foi obtida no todo intervalo de concentração estudado (Figura 30 B) com equação de regressão linear de $\Delta j/\mu\text{Acm}^{-2} = 6,5 \times 10^4 / \mu\text{A L mol}^{-1} - 0,2236 / \mu\text{A cm}^{-2}$, $r = 0,9988$, cujos parâmetros obtidos para esta curva estão reunidos na Tabela 10.

Figura 30: (A) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona em NaOH (pH 12,0): na ausência (a) e na presença de estrona (b) $4,0 \times 10^{-8}$; (c) $8,0 \times 10^{-8}$; (d) $4,0 \times 10^{-7}$; (e) $6,0 \times 10^{-7}$; (f) $8,0 \times 10^{-7}$; (g) $2,0 \times 10^{-6}$; (h) $6,0 \times 10^{-6}$; (i) $8,0 \times 10^{-6}$; (j) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando eletrodo de diamante dopado com boro ($f = 60 \text{ Hz}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$). (B) Curva de calibração obtida a partir desses voltamogramas.



Para a construção da curva de calibração, as correntes mostradas nos voltamogramas de onda quadrada foram subtraídas a partir da corrente de fundo.

A partir dos parâmetros extraídos da curva de calibração e apresentados na Tabela 10, foi possível calcular o limite de detecção (LD) do sistema, empregando a seguinte relação matemática: $LD = 2,5 s / S$. O LD obtido foi de $1,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 10). Além disso, o limite de quantificação (LQ) foi calculado utilizando a equação: $LQ = 10 s / S$. O LQ calculado para a estrona foi de $3,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 10: Parâmetros de validação do método proposto para determinação de estrona.

Parâmetro	Valor
Potencial de pico (V)	0,48
Faixa linear (mol L^{-1})	$4,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-5}$
Coefficiente de correlação	0,9988
Inclinação ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) ($\times 10^4$)	6,50
Desvio padrão da curva ($\mu\text{A L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) ($\times 10^2$)	7,39
Intercepto ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	0,2236
Desvio padrão do intercepto ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	0,0035
Limite de detecção (mol L^{-1})	$1,3 \times 10^{-8}$
Limite de quantificação (mol L^{-1})	$3,8 \times 10^{-8}$
Repetibilidade da corrente de pico (%) ^{a,b}	0,73
Repetibilidade da corrente de pico (interdia) (%) ^{a,b}	1,96
Repetibilidade da corrente de pico (intradia) (%) ^{a,b}	1,04
Repetibilidade do potencial de pico (%) ^{a,b}	1,05
Repetibilidade do potencial de pico (interdia) (%) ^{a,b}	2,01
Repetibilidade do potencial de pico (intradia) (%) ^{a,b}	1,72

^a Desvio padrão relativo, ^b n = 5

A repetibilidade de cinco medições da corrente de pico para as soluções de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de estrona, em condições otimizadas, apresentou desvio padrão de 0,73%. A repetibilidade da corrente pico foi testada por meio de duas metodologias: interdia, ao longo de 5 dias, utilizando diferentes soluções preparadas na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e intradia, utilizando cinco diferentes soluções preparadas no mesmo dia e a mesma concentração de estrona ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Os desvios padrões relativos (n = 5) foram 1,96 e 1,04 %, respectivamente. Bons resultados também foram obtidos para a repetibilidade do potencial de pico, como pode ser visto na Tabela 10.

Estes resultados demonstram que o método proposto mostra excelente precisão, repetibilidade e sensibilidade indicando detectibilidade aceitável. Além disso, viabiliza a utilização da técnica no desenvolvimento de um método eletroanalítico para quantificação de estrona em amostras de produtos lácteos.

5.2.8 Determinação e recuperação de estrona em amostras de produtos lácteos

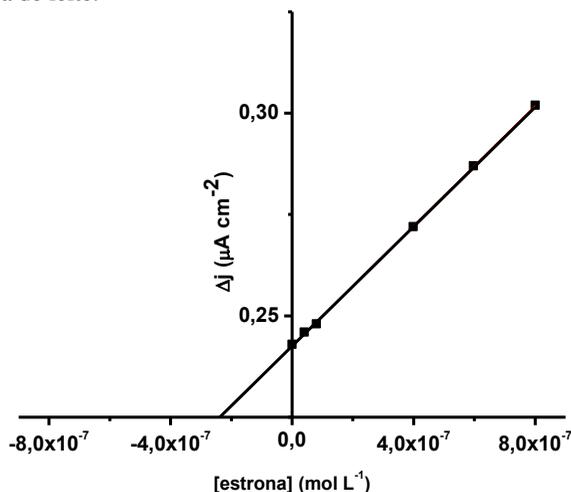
A metodologia proposta foi aplicada para determinação de estrona em amostras de leite, manteiga e nata utilizando o método de adição de padrão que é muito utilizado por ser realizado nas condições da matriz.

Todas as amostras foram tratadas com etanol (como descrito no item 4.1.3) a fim de eliminar os possíveis interferentes que seriam as proteínas, gorduras e a lactose. Por esse motivo, não foram realizados testes de interferentes.

5.2.8.1 Determinação de estrona em amostra de leite

Os resultados obtidos para quantificação de estrona em amostra de leite através do método de adição do padrão proposto e do método de radioimunoensaio são apresentados na Tabela 11. A Fig. 31 mostra a dependência da Δj em função da concentração de estrona para amostra de leite utilizando o método proposto.

Figura 31: Dependência da Δj em função da concentração de estrona para amostra de leite.



Os valores médios para as cinco determinações ($n = 5$) de ambas as técnicas foram muito próximos do valor encontrado por Hartmann *et al.* (1998), os quais comparamos a seguir.

A partir dos valores de desvio padrão relativo (D.P.R.) avaliados para as medidas aplicadas na adição do padrão, foi possível estimar a precisão do método proposto. Estes resultados são satisfatórios, de modo que pode ser uma alternativa para quantificação deste hormônio em matrizes como o leite. A curva de adição de padrão apresentada na Figura 31 foi linear em todo intervalo de concentração adicionado e para um $r = 0,991$ apresentou inclinação de $7,45 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$ cujo valor está praticamente na mesma ordem de grandeza quando comparada com aquela obtida com o padrão da estrona, representado na Tabela 10.

Na Tabela 11 encontra-se a comparação dos métodos apresentando valores para a determinação, desvio padrão relativo, erro e teste estatístico F. Os limites de confiança foram calculados para um nível de significância de 0,05.

Tabela 11: Determinação de estrona em amostra de leite

Método	Radioimunoensaio	Eletroanalítico	Hartmann <i>et al.</i> (1998)
Encontrado (mol L^{-1}) ^a	$1,33 \times 10^{-6}$	$1,43 \times 10^{-6}$	$4,18 \times 10^{-6}$
D.P.R. (%)	0,87	1,06	-
Er (%) ^b	-	+7,51	-
F _{valor} ^c	1,75	1,75	-

^a $n = 5$

^b Er = erro relativo entre os métodos eletroanalítico e radioimunoensaio

^c F_{teórico} = 6,39

A porcentagem de recuperação encontrada para as cinco determinações está apresentada na Tabela 12. Os valores de recuperação são bastante satisfatórios, estando dentro da faixa de aceitação (106 – 109 %) e indicam a viabilidade de utilização do método para determinação da estrona em amostras de leite.

Tabela 12: Estudos de recuperação de estrona em amostra de leite.

Amostra	Adicionado ^a	Encontrado	Recuperado (%)
Leite (mol L ⁻¹)	4,00 x 10 ⁻⁸	4,41 x 10 ⁻⁸	109
	8,00 x 10 ⁻⁸	8,81 x 10 ⁻⁸	109
	4,00 x 10 ⁻⁷	4,38 x 10 ⁻⁷	109
	6,00 x 10 ⁻⁷	6,42 x 10 ⁻⁷	106
	8,00 x 10 ⁻⁷	8,52 x 10 ⁻⁷	106

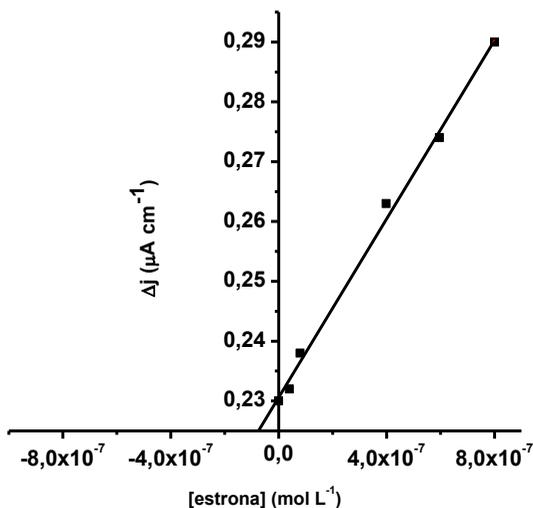
^a n = 5

5.2.8.2 Determinação de estrona em amostra de manteiga

A metodologia eletroanalítica descrita anteriormente e o método padrão de radioimunoensaio para a determinação de estrona foram aplicados neste ensaio na determinação do hormônio em uma amostra de manteiga.

A Fig. 32 mostra a relação entre a concentração de estrona adicionada à amostra de manteiga e Δ_j . Os valores médios para as cinco determinações (n = 5) estão dispostos na Tabela 13. Os limites de confiança foram calculados para um nível de significância de 0,05.

Figura 32: Dependência da Δj em função da concentração de estrona para amostra de manteiga.



Na Tabela 13 podemos comparar os valores obtidos com os dois métodos (o proposto e o radioimunoensaio) com o valor encontrado por Hartmann *et al.* (1998) para o mesmo tipo de amostra. Observa-se que os valores são concordantes e através dos cálculos de erro entre os métodos utilizados neste trabalho e dos valores obtidos a partir do teste F, entendemos que não há diferença significativa entre eles, indicando desempenho excelente do método eletroanalítico quando comparado ao método padrão.

Tabela 13: Determinação de estrona em amostra de manteiga.

Método	Radioimunoensaio	Eletroanalítico	Hartmann <i>et al.</i> (1998)
Encontrado (mol L ⁻¹) ^a	4,39 x 10 ⁻⁷	4,43 x 10 ⁻⁷	4,91 x 10 ⁻⁷
D.P.R. (%)	0,34	0,35	-
Er (%) ^b	-	+ 0,91	-
F _{valor} ^c	1,0	1,0	-

^a n = 5

^b Er = erro relativo entre os métodos eletroanalítico com o radioimunoensaio

^c F_{teórico} = 6,39

Testes de recuperação foram realizados na presença da amostra real (método da adição de padrão). Como demonstrado na Tabela 14, a recuperação de estrona variou de 105 – 109 %.

Além disso, a inclinação da reta $7,47 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ($r = 0,995$), obtida a partir da curva de determinação representada na Fig. 32, é muito próxima do valor da inclinação da curva de calibração, indicando a excelente seletividade do método proposto.

Tabela 14: Estudos de recuperação de estrona em amostra de manteiga.

Amostra	Adicionado ^a	Encontrado	Recuperado (%)
Manteiga (mol L ⁻¹)	4,00 x 10 ⁻⁸	4,39 x 10 ⁻⁸	109
	8,00 x 10 ⁻⁸	8,68 x 10 ⁻⁸	108
	4,00 x 10 ⁻⁷	4,22 x 10 ⁻⁷	105
	6,00 x 10 ⁻⁷	6,37 x 10 ⁻⁷	106
	8,00 x 10 ⁻⁷	8,46 x 10 ⁻⁷	105

^a n = 5

Percebemos que o método proposto não sofre interferência significativa de efeitos de matriz, podendo, portanto, ser aplicado com sucesso aos ensaios de determinação de estrona em amostra de manteiga.

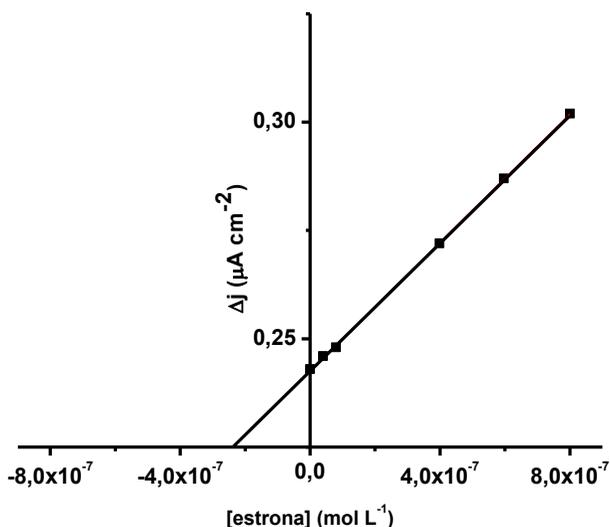
5.2.8.3 Determinação de estrona em amostra de nata

Neste estudo, o método eletroanalítico proposto foi aplicado na determinação de estrona em amostra de nata. O mesmo método padrão de radioimunoensaio também foi utilizado.

A Fig. 33. mostra a relação entre a concentração de estrona e Δj . Os valores médios para as cinco determinações ($n = 5$) estão dispostos na Tabela 15.

Na Tabela 15 podemos comparar o valor obtido por Hartmann *et al.* (1998) com os valores encontrados pelos dois métodos (o proposto e o radioimunoensaio).

Figura 33: Dependência da Δj em função da concentração de estrona para amostra de nata.



A inclinação da reta obtida a partir dos dados da Fig. 32 ($7,41 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ($r = 0,999$)) é muito próxima do valor obtido a partir da curva de calibração indicando assim boa seletividade do método proposto.

Com o intuito de verificar se a diferença encontrada entre os métodos é significativa, aplicou-se o teste F com limite de confiança calculado para um nível de significância de 0,05. Observa-se, na Tabela 15, que os valores são concordantes, indicando que o desempenho do método eletroanalítico foi satisfatório quando comparado ao método padrão.

Tabela 15: Determinação de estrona em amostra de nata.

Método	Radioimunensaio	Eletroquímico	Hartmann <i>et al.</i> (1998)
Encontrado (mol L^{-1}) ^a	$1,36 \times 10^{-6}$	$1,45 \times 10^{-6}$	$2,69 \times 10^{-6}$
D.P.R. (%)	0,85	1,73	-
Er (%) ^b	-	+6,62	-
F_{valor} ^c	4,75	4,75	-

^a $n = 5$ ^b Er = erro relativo entre os métodos eletroanalítico e radioimunoensaio

^c $F_{\text{teórico}} = 6,39$

Outros valores que corroboram com o bom desempenho do método são os encontrados no teste de recuperação na presença da amostra real.

Como podemos observar na Tabela 16, a recuperação de estrona variou de 107 - 111%.

Tabela 16: Estudos de recuperação de estrona em amostra de nata.

Amostra	Adicionado ^a	Encontrado	Recuperado (%)
Concentração de estrona em Nata (mol L ⁻¹)	4,00 x 10 ⁻⁸	4,43 x 10 ⁻⁸	111
	8,00 x 10 ⁻⁸	8,82 x 10 ⁻⁸	110
	4,00 x 10 ⁻⁷	4,41 x 10 ⁻⁷	110
	6,00 x 10 ⁻⁷	6,47 x 10 ⁻⁷	108
	8,00 x 10 ⁻⁷	8,59 x 10 ⁻⁷	107

^a n = 5

Comparando-se os valores de estrona encontrados em todas as amostras (leite, manteiga e nata), percebe-se que a concentração encontrada na amostra de leite é aproximadamente 100 vezes menor do que a encontrada nas amostras de manteiga e nata (que apresentaram valores próximos). Essa discrepância pode se dar pela quantidade de gordura em cada amostra. O leite tipo B, utilizado neste trabalho tem em média 3% de gordura, já a nata e a manteiga apresentam aproximadamente 80%. Considerando que a molécula de estrona é lipossolúvel, quanto maior a quantidade de gordura na amostra, maior também será a concentração de estrona.

Por fim, percebemos que o método proposto não sofreu interferência significativa de efeitos de matriz em nenhuma de suas aplicações, podendo, portanto, ser aplicado com sucesso aos ensaios de determinação de estrona em amostra de leite, manteiga e nata.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os desreguladores endócrinos têm sido destaque entre trabalhos de química analítica pela necessidade emergente de desenvolvimento de técnicas que possam quantificar a contento esses compostos. Em destaque podemos citar os hormônios sexuais femininos tendo em vista que a concentração destes, principalmente em meio aquático e em alimentos, tem crescido alarmantemente nas últimas décadas impulsionado principalmente pela expansão da indústria farmacêutica.

Neste trabalho desenvolveu-se metodologia de quantificação para dois hormônios sexuais femininos estriol e estrona.

Para o desenvolvimento da metodologia de quantificação foi utilizado o eletrodo de diamante dopado com boro. Outros eletrodos também foram testados: o de ouro, platina e cobre, porém, sobre essas superfícies não foi observado sinal analítico para estes hormônios. Testes utilizando o eletrodo de carbono vítreo também foram realizados contudo, os sinais obtidos sobre esta superfície foram insatisfatórios se comparados aos obtidos sobre a superfície do eletrodo de diamante dopado com boro.

Os dados iniciais obtidos para os hormônios estriol e estrona empregando a técnica de voltametria cíclica sobre a superfície do eletrodo de diamante dopado com boro foram fundamentalmente importantes para o conhecimento prévio do comportamento eletroquímico bem como da caracterização dos processos de transferência de elétrons envolvidos na oxidação de ambos os hormônios.

Percebeu-se que para ambos os hormônios as reações de transferência de elétrons são irreversíveis e controladas por difusão, com pequena contribuição da adsorção.

Além disso, a correlação dos resultados diagnosticados no processo eletródico com aqueles encontrados na literatura para o estudo do comportamento eletroquímico de compostos similares aos hormônios confirma as evidências acima citadas.

As metodologias eletroanalíticas empregando a voltametria de onda quadrada sobre a superfície do eletrodo de diamante dopado com boro apresentaram grande potencialidade para monitoramento desses hormônios em diferentes amostras. Estas apresentam grande vantagem se considerarmos os aspectos positivos de sensibilidade, faixa de linearidade, precisão e ainda um limite de quantificação compatível com o nível de concentração encontrado nessas matrizes.

Os métodos analíticos desenvolvidos empregando as técnicas eletroquímicas mostraram-se competitivas em relação a outros métodos e podem ser uma excelente alternativa na determinação de hormônios em fluidos biológicos (urina), em formulações farmacêuticas e em produtos lácteos principalmente considerando a complexidade de matrizes como estas.

A alta sensibilidade dos dois métodos desenvolvidos permitiu o uso de pequenas quantidades de amostra minimizando assim o efeito de matriz.

Outro aspecto positivo observado foi a ausência de pré-tratamento na determinação do hormônio estriol em uma amostra complexa, no caso, a urina. Por conseguinte, isto confere viabilidade de uso da metodologia proposta para a determinação do estriol em amostras de urina recolhidas durante a gravidez. Além disso, para as amostras de produtos lácteos onde houve necessidade de pré-tratamento, na determinação de estrona, este foi realizado de forma simples e rápida.

Finalmente, os métodos desenvolvidos apresentam resultados analíticos satisfatórios, cujas informações são de grande relevância em estudos quantitativos envolvendo estas classes de compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AL-ANSARI, A. M. *et al.* The development of an optimized sample preparation for trace level detection of 17 α -ethinylestradiol and estrone in whole fish tissue. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3649-3652, 2011.

ALVES, C., FLORES, L. C., CERQUEIRA, T. S., TORALLES, M. B. P. Exposição Ambiental a Interferentes Endócrinos com Atividade Estrogênica e sua Associação com Distúrbios Puberais em Crianças. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, p. 1005-1014, 2007.

ANDERSEN, H. R. *et al.* Assessment of the Importance of Sorption for Steroid Estrogens Removal during Activated Sludge Treatment. **Chemosphere**, v. 61, p. 139-146, 2005.

ANDERSEN, H., SIEGRIST, H., HALLING-SORENSEN, B., TERNES, T. Fate of Estrogens in a Municipal Sewage Treatment Plant, **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 4021-4026, 2003.

ANVISA Nº. 302, de 13 de outubro de 2005. RESOLUÇÃO – RDC.

AZZOUZ, A., BALLESTEROS, E. Gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmacologically active substances in urine and blood samples by use of a continuous solid-phase extraction system and microwave-assisted derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 891– 892. p. 12– 19, 2012.

AZZOUZ, A.; SOUHAIL, B.; BALLESTEROS, E. Continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2956–2963, 2010.

BACHMANN, P.K.; MESSIER R. Emerging Technology of Diamond Thin Films. **Chemical Engineer News**, v.67, p.24-27, 1989

BAKER, V. A. Endocrine Disrupters - Testing Strategies to Assess Human Hazard. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 413–419, 2001.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods Fundamentals and Applications**, 2. Ed. New York: John Wiley & Sons, p. 833, 1980.

BARONTI, C.; CURINI, R.; ASCENZO, G. D'; CORCIA, A. D.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 5059-5066, 2000.

BELFROID, A.C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A.D.; SCHÄFER, A.J.; RIJS, G.B.J.; WEGENER, J.; COFINO, W.P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 101-108, 1999.

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

BOGDANOWICZ, R. *et al.* Determination of chemical oxygen demand (COD) at borondoped diamond (BDD) sensor by means of amperometric technique. **Procedia Engineering**, v. 47. p. 1117 – 1120, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. Sislegis. Instrução Normativa. DAS n.22, 14 de abril de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal.

BRETT, A.; M.O.; BRETT, C.M.A. **Eletroquímica**: princípios, métodos e aplicações. Coimbra: Oxford University Press, 1993. p. 241.

BROSSA, L., MARCÉ, R. M., BORRULL, F., POCURULL, E. Application of on-line Solid-Phase Extraction-Gas Chromatography-

Mass Spectrometry to the Determination of Endocrine Disruptors in Water Samples. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 287-294, 2002.

BUNDY, F.P. Direct conversion of graphite to diamond in static pressure apparatus, **Journal of Chemical Physics**, v.38, p.631-&, 1963

CAMILLERIA, J. *et al.* Determination of the uptake and release rates of multifamilies of endocrine disruptor compounds on the polar C18 Chemcatcher. Three potential performance reference compounds to monitor polar pollutants in surface water by integrative sampling. **Journal of Chromatography A**, v. 1237. p. 37– 45, 2012.

CARGOUËT, M., PERDIZ, D., MOUATASSIM-SOUALI, A., TAMISIER-KAROLAK, S., LEVI, Y. Assessment of River Contamination by Estrogenic Compounds in Paris Área (France). **Science of the Total Environmental**, v. 324, p. 55-66, 2004.

CASTRO, C. M. B. Perturbadores Endócrinos Ambientais: Uma Questão a Ser Discutida. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, p. 4-5, 2002.

CEC - COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Community strategy for endocrine disruptors**: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the Council and the European Parliament. Brussels: CEC, 1999. (COM, 706 Final).

CHANG, C.; HUANG, S. Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p.39–43, 2010.

CHEN, H.; KUO, H.; DING, W.; Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography–tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. **Chemosphere**, v. 74, p. 508–514, 2009.

CHEN, J.; LIANG, Q.; HU, H.; WANG, Y.; LUO, G.; HU, M.; NA, Y. Simultaneous determination of 15 steroids in rat blood via gas chromatography–mass spectrometry to evaluate the impact of emasculation on adrenal. **Talanta**, v. 80, p. 826–832, 2009.

CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations. **Diamond and Related Materials**, v.11, p.1670-1675, 2002.

COLEMAN, H. M., ABDULLAH, M. I., EGGINS, B. R., PALMER, F. L. Photocatalytic Degradation of 17 β -estradiol, estriol and 17 α -Ethinylloestradiol in Water Monitored Using Fluorescence Spectroscopy. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 55, p. 23-30, 2005.

COLEMAN, H. M., ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P., EGGINSA, B. R., BYRNE, J. A. Rapid Loss of Estrogenicity of Steroid Estrogens by UVA Photolysis and Photocatalysis over an Immobilised Titanium Dioxide Catalyst. **Water Research**, v. 38, p. 3233-3240, 2004.

D'ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A., MANCINI, R., MASTROPASQUA, R., NAZZARI, M., SAMPERI, R. Fate of Natural Estrogen Conjugates in Municipal Sewage Transport and Treatment Facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199–209, 2003.

DASTON, G. P., GOOCH, J. W., BRESLIN, W. J., SHUEY, D. L., NIKIFOROV, A. I., FICO, T. A., GORSUCH, J. W. Environmental Estrogens and Reproductive Health: a Discussion of the Human and Environmental Data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, p. 465-481, 1997.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 32, p. 1549-1558, 1998.

DUO, P. *et al.* Activation of Boron-Doped Diamond with IrO₂ Clusters. **Electrochemical and Solid-State Letters**, v.3. p. 325-326, 2000.

EPA; *Report No.* EPA/600/R-98/042 Washington D.C., 1998.

FENLON, K. A.; , JOHNSON, A. C.; TYLER, C. R.; HILL, E. M. Gas-liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the quantitation of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents and from wild populations. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 112-118, 2010.

FENT, K.; ESCHER, C.; CAMINADA, D. Estrogenic Activity of Pharmaceuticals and Pharmaceutical Mixtures in a Yeast Reporter Gene System. **Reproductive Toxicology**. v. 22, p. 175-185, 2006.

FERRETTI, G.; FERRANTI, C.; CROVELLA, T.; *et al.* Simultaneous analysis of 17 α -estradiol and 17 β -estradiol in bovine serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 135-140, 2008.

FERRO, S.; DE BATTISTI, A. Electron transfer reactions at conductive diamond electrodes, **Electrochimica Acta**, v.47, n.10, p.1641-1649, 2002.

FIERS, T. *et al.* Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 893- 894. p. 57- 62, 2012.

FISHER, V.; GANDINI, D.; LAUFER, S.; BLANK, E.; COMNINELLIS, C. Preparation and characterization of Ti/Diamond electrodes, **Electrochimica Acta**, v.44, p. 521- 524, 1998.

FOLMAR, L. C., HEMMER, M. J., DENSLow, N. D., KROLL, K., CHEN, J., CHEEK, A., RICHMAN, H., MEREDITH, H., GRAU, E. G. A Comparison of the Estrogenic Potencies of Estradiol, Ethynylestradiol, Diethylstilbestrol, Nonylphenol and Methoxychlor in Vivo and in Vitro. **Aquatic Toxicology**, v. 60, p. 101-110, 2002.

FORNAZARI, A. L. T. Tratamento eletroquímico de resíduos industriais contendo misturas de fenol e formaldeído. **Dissertação de mestrado**. UFSCar, 2009.

FRANÇA, R. F. *et al.* Electroanalytical determination of carbendazim and fenamiphos in natural waters using a diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 27–28, p. 54–59, 2012.

GABET, V.; MIEGE, C.; BADOS, P.; COQUERY, M. Analysis of estrogens in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 1113-1131, 2007

GALATO, D. *et al.* Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. **Redox Report**. v. 6, p. 243-250, 2001.

GASCON, J.; OUBINA, A.; BARCELO, D. Detection of Endocrine Disrupting Pesticides by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): Application to Atrazine. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 16, p. 554-562, 1997.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes endócrinos no ambiente, **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GIACOMELLI, C. *et al.* Antioxidant activity of phenolic and related compounds: a density functional theory study on the O-H bond dissociation enthalpy. **Redox Report**. v. 9, n.5, p. 263-269, 2004.

GIACOMELLI, C. *et al.* Electrochemistry of caffeic acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 13, n.3, p. 332-338, 2002.

GOETING, C.H.; MARKEN, F.; GUTIÉRREZ-SOSA, A.; COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. Electrochemically induced surface modifications of boron-doped diamond electrodes: an X-ray photoelectron spectroscopy study, **Diamond and Related Materials**, v.9, n.3-6, p.390-396, 2000.

GOMES, R. L., AVCIOGLU, E., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. Steroid Estrogen Determination in Sediment and Sewage Sludge: a Critique of Sample Preparation and Chromatographic/Mass Spectrometry

Considerations, Incorporating a Case Study in Method Development. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, 2004.

GRANGER, M.C.; SWAIN, G.M. The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes, **Journal of the Electrochemical Society**, v.146, n.12, p.4551-4558, 1999

GRAY JR, L. E. Xenoendocrine Disrupters: Laboratory Studies on male Reproductive Effects. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 331-335, 1998.

GROVER, D.P.; ZHANG, Z.L.; READMAN, J.W.; ZHOU, J.L. A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. **Talanta**, v. 78, p. 1204–1210, 2009.

HARRISON, P. T. C.; HOLMES, P.; HUMFREY, C. D. N. Reproductive Health in Humans and Wildlife: Are Adverse Trends Associated With Environmental Chemical Exposure?. **The Science of the Total Environment**, v. 205, p. 97-106, 1997.

HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. **Food Chemistry**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 7-20, 1998.

HAUSER, B.; DESCHNER, T.; BOESCH, C. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine. **Journal of Chromatography B**, v. 862, p. 100–112, 2008.

HERNANDO, M. D., MEZCUA, M., GÓMEZ, M. J., MALATO, O., AGÜERA, A., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Comparative Study of Analytical Methods Involving Gas Chromatography-Mass Spectrometry After Derivatization and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Selected Endocrine Disrupting Compounds in Wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 129-135, 2004.

HOSOGI, J.; TANAKA, H.; FUJITA, K.; KUWABARA, T.; IKEGAWA, S.; KOBAYASHI, N.; MANO, N.; GOTO, J. LC–MS/MS

coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17 β -estradiol and estrone 3-sulfate in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 222–227, 2010.

HU, S.; WU, K.; YI, H.; CUI, D. Voltammetric behavior and determination of estrogens at nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. **Analytica Chimica Acta**, v. 464, p. 209-216, 2002.

HU, Y. *et al.* Preparation and evaluation of a porous monolithic capillary column for microextraction of estrogens from urine and milk samples online coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1228. p. 205– 212, 2012.

HU, Y.; WANG, Y.; CHEN, X.; HU, Y.; LI, G. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. **Talanta**, v. 80, p. 2099–2105, 2010.

HUMAN DO BRASIL. **Estriol**. Itabira, 2008. 3 p. Disponível em: http://www.humandobrasil.com.br/site_arquivos/pdf/FISPQ/estriol.pdf. Acesso em: 4 ago. 2009.

KOH, *et al.* Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 81–87, 2007.

JEANNOT, R., SABIK, H., SAUVARD, E., DAGNAC, T., DOHRENDORF, K. Determination of Endocrine-Disrupting Compounds in Environmental Samples using Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 143–159, 2002.

JIN, G.; LIN, X. Voltammetric behavior and determination of estrogens at carbamylcholine modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 3556-3562, 2005.

JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHTY, G., SUMPTER, J. P. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. **Environmental Science Technology**, v. 32, p. 2498-2506, 1998.

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**, Amsterdam, v. 256, p. 163-173, 2000.

JOHNSON, A.C.; SUMPTER, J.P.; Removal of endocrine disrupting chemicals in activated sludge treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 4697-4703, 2001.

KAMO, M.; SATO, Y.; MATSUMOTO, S.; SETAKA, N. Diamond synthesis from gas phase in microwave plasma, **Journal of Crystal Growth**, v.62, p. 642-644, 1983.

KOZLIKA, P. *et al.* Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218. p. 2127–2132, 2011.

KUMAR, K.A.; 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**, India, v. 164, p. 820–828, 2009.

KUMAR, V.; NAKADA, N.; YASOJIMA, M.; YAMASHITA, N.; JOHNSON, A. C.; TANAKA, H. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 77, p. 1440–1446, 2009.

LAI, K. M., JOHNSON, K. L., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. **Environment Science Technology**, v. 34, p. 3890-3894, 2000.

LAI, K. M., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. The Effects of Natural and Synthetic Steroid Estrogens in Relation to their Environmental Occurrence. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 32, p. 113-132, 2002.

LARSEN, P. R. *et al.* Williams Textbook of Endocrinology. 10a. ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2003.

LEVENT, A. Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 21. p. 114-119, 2012.

LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; PORTELA, R. R. et al. Square wave voltammetric determination of nitrofurantoin in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes at different boron-doping contents. **Talanta**, v. 80, p. 1730–1736, 2010.

LIN X.; LI, Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensores & Bioelectronics**, v. 22, p. 253-259, 2006.

LOURENÇÃO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C. et al. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 78, p. 748–752, 2009.

LUCCI, P. *et al.* Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural and synthetic estrogens from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218. p. 4828–4833, 2011.

LUONG, H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. **Analyst**, v. 134, p. 1965 – 1979, 2009.

MA, X. *et al.* Determination of endocrine-disrupting compounds in water by carbon nanotubes solid-phase microextraction fiber coupled online with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 85. p. 2212– 2217, 2011.

MAHE, E.; DEVILLIERS, D.; COMMINELLIS, C. Electrochemical reactivity at graphitic micro-domains on polycrystalline boron doped diamond thin-films electrodes, **Electrochimica Acta**, v.50, n.11, p.2263-2277, 2005.

MAIER, F.; RIEDEL, M.; MANTEL, B.; RISTEIN, J.; LEY, L. Origin of surface conductivity in diamond, **Physical Review Letters**, v.85, n.16, p.3472-3475, 2000.

MATEJICEK, D.; HOUSEROVA, P.; KUBAN, V. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 80–89, 2007.

MATEJICEK, D.; KUBAN, V. Enhancing sensitivity of liquid chromatographic/ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens by on-line pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, p. 248–253, 2008.

MATSUMOTO, S.; SATO, Y.; TSUTSUMI, M.; SETAKA, N. Growth of diamond particles from methane-hydrogen gas, **Journal of Material Science**, v.17, p.3106-3112, 1982.

McDONALD, R. D. The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 149-158 1999.

MEDEIROS, R. A. *et al.* Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v.97. p. 291–297, 2012.

MEDEIROS, R. A.; CARAVALHO, A. E.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode, **Talanta**, v. 76, p. 685–689, 2008.

MEYER, A., SARCINELLI, P. N., MOREIRA, J. C. Estarão Alguns Grupos Populacionais Brasileiros Sujeitos à Ação de Disruptores Endócrinos?. **Caderno de Saúde Pública**, v. 15, p. 845-850, 1999.

MIEGE, C.; BADOS, P.; BROSSE, C.; COQUERY, M. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 237-244, 2009

NASH, J. P., KIME, D. E., VAN DER VEN, L. T. M., WESTER, P. W., BRION, F., MAACK, G., STAHLSCHMIDT-ALLNER, P., TYLER, C. R. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the

Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, 2004.

NGUNDI, M. M. *et al.* First comparative reaction mechanisms of β -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. **Electrochemistry Communications**, v. 5. p. 61–67, 2003.

NGUYENA, H. P. *et al.* Simultaneous quantification of four native estrogen hormones at trace levels in human cerebrospinal fluid using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54. p. 830–837, 2011.

NIE, Y.; QIANG, Z.; ZHANG, H.; ADAMS, C. Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of active sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7071-7080, 2009.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, p. 224–230, 2008.

NOGUEIRA, J. M. F.; Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química Nova**, v. 88, p.65-71, 2003.

NUWER, M.J.; O'DEA, J.J.; OSTERYOUNG, J. Analytical and kinetic investigations of totally irreversible electron transfer reactions by square wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 251, p. 13-25, 1991.

O'DEA, J.J.; RIBES, A. OSTERYOUNG, J.G. Square wave voltammetry applied to the totally irreversible reduction of adsorbate. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 345, p. 3287-301, 1993.

OLEA, N., FERNÁNDEZ, M. F., ARAQUE, P., OLEA-SERRANO, F. Perspectivas en Disrupción Endocrina. **Gaceta Sanitaria**, v. 16, n. 3, 2002.

PEDROUZO, M.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 1327–1331, 2009.

PENNING, T. M. *et al.* Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) of steroid hormone metabolites and its applications. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.121. p. 546–555, 2010.

PEREIRA, G. *et al.* Electrochemical determination of bisphenol A using a boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 82, p. 3-8, 2012.

PEREIRA, R. O. Formação de subprodutos do estrona e 17 β - estradiol na oxidação utilizando cloro e o ozônio em água. **Tese de doutorado**. UFSCar, 2011.

PETERSON, E. W.; DAVIS, R. K.; ORNDORFF, H. A. 17 β -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in Mantled Karst Aquifers. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 29, p. 826-834, 2000.

PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P. Comprehending endocrine disrupters in aquatic environments: additional projects arose from a three-year, multinational, multidisciplinary research program in the European Union. **Environmental Science & Technology**, v.1, p. 331-336, 2003.

PLESKOV, Y.V. Electrochemistry of diamond: A review. **Russian Journal of Electrochemistry**, v.38, n.12, p.1275-1291, 2002.

PREZIOSI, P. Endocrine disrupters as environmental signalers: an introduction. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 1617-1631, 1998.

PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oestrogenic Effects of Effluent from Sewage Treatment Works, **Chemistry and Ecology**, v. 8, p. 75–85, 1994.

QUINTANA, J. B. *et al.* Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1024. p. 177–185, 2004.

RAMALEY, L.; KRAUSE, M.S. Theory of square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v.41, n. 11, p. 1362-1369, 1969.

RAO, N.T.; FUJISHIMA, A. Recent advances in electrochemistry of diamond, **Diamond and Related Materials**, v.9, n.3-6, p.384-389, 2000.

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

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

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

ROSSI, M.C.; SPAZIANI, F.; SALVATORI, S.; CONTE, G. Electronic properties of hydrogen and oxygen terminated surfaces of polycrystalline diamond films, **Physica Status Solidi A-Applied Research**, v.199, n.1, p.71-76, 2003.

ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G. C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J. P. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach, **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 1559-1565, 1998.

ROUTLEDGE, E.J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 241-248, 1996.

SERVOS, M. R. *et al.* Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 336, p. 155– 170, 2005.

SILVA, M. R. C. Utilização de metodologia eletroanalítica para estudos de adsorção de pesticidas triazínicos em amostras de sedimentos do rio Mogi-Guaçu – SP. 2006. 135f. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SKAKKEBAEK, N. E. TOPPARI, J. et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? **APMIS** 106: 3-12. 1998.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Editora Brookman, 2002. p. 566-593.

SLACK, G.A., BARTRAM, S.F. Thermal-Expansion of Some Diamond-Like Crystals. **Journal of Applied Physics**, v.46, p.89-98, 1975.

SODRÉ, F. F.; PESCARA, I. C.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 2010.

SOLÉ, M.; RALDUA, D.; BARCELÒ, D.; PORTE, C. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 56, p. 373-380, 2003.

SOLOMON, G.M.; SCHETTLER, T. Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications. **CMAJ**. 163: 1471-1476, 2000.

SOUZA, C. D.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B**, v.135, p. 66–73, 2008.

SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SUFFREDINI, H.B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; ROCHA-FILHO, R.C.; MACHADO, S.A.S; AVACA, L.A. Enhanced electrochemical response of borondoped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, v.49, p.4021-4026, 2004.

SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 102-103, p. 337-342, 1998.

ŠVORC, L. *et al.* Voltammetric determination of caffeine in beverage samples on bare boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, v. 135. p.1198–1204, 2012a.

ŠVORC, L. *et al.* Voltammetric determination of penicillin V in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 88. p. 36–41, 2012b.

SWAIN, G.M. The susceptibility to surface corrosion in acidic fluoride media – a comparison of diamond, HOPG and glassy carbon electrodes. **Journal of the Electrochemical Society**, v.141, p.3382-3393, 1994.

TANAKA, H., YAKOU, Y., TAKAHASHI, A., HIGASHITANI, T., KOMORI, K. Comparison between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast Assay and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment, **Water Science and Technology**, v. 43, p. 125–132, 2001.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; TEW, K. D. Estrogen and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, p.36-44, 2002.

TENNE, R.; LÉVY-CLÉMENT, C. Diamond electrodes. **Israel Journal of Chemistry**, v.38, p.57-73, 1998.

URASE, T.; KIKUTA, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. **Water Research**, v. 39, p. 1289-1300, 2005.

USLU, B. *et al.* Electroanalytical investigation and determination of pefloxacin in pharmaceuticals and serum at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 74. p. 1191–1200, 2008.

VARNIN, V.P. Thermodynamic and Kinetic Factors in Diamond Crystallization Under Metastable Conditions. **Carbon**, v.28, p.795,1990.

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

VEGA-MORALES , T. *et al.* Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 β -ethynylestradiol and 17 α -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183. p. 701–711, 2010.

VEGA-MORALES , T. *et al.* Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1230. p. 66–76, 2012.

VIGLINO, L.; ABOULFADL, K.; PREVOST, M.; SAUVE, S. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. **Talanta**. v. 76, p. 1088–1096, 2008.

VINOKUR, N.; MILLER, B.; AVYIGAL, Y.; KALISH, R. Electrochemical behavior of boron-doped diamond electrodes, **Journal of the Electrochemical Society**, v.143, p. L238-L240, 1996.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New York: VCH publishers, p. 1, 161-173, 1994.

WANG, J. *et al.* Ultrasound electrochemical determination of chemical oxygen demand using boron-doped diamond electrode. **Electrochemistry Communications**. v. 18. p.51–54, 2012a.

WANG, L. *et al.* Chemiluminescence of CdTe nanocrystals catalyzed by sodium hexametaphosphate and its sensitive application for

determination of estrogens. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 91. p. 295–300, 2012b.

WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G.; HE, J.; ZHANG, Y. On-line coupling of solidphase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 194-201, 2008.

WANG, Y. *et al.* Electrochemical detection of surfactant cetylpyridinium bromide using boron-doped diamond as electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 13 . p. 82–85, 2011.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disrupters: a human risk? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, n. 1-2, p. 2-9, 2005.

WELTRING, A. *et al.* Simultaneous measurement of endogenous steroid hormones and their metabolites with LC–MS/MS in faeces of a New World primate species, *Cebus capucinus*. **Physiology & Behavior**, v. 105. p. 510–521, 2012.

WU, Z.Y.; YANO, T.; TRYK, D.A.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A. Observation of Electrochemical C-60 Reduction of a Diamond Thin Film Electrode at Room Temperature. **Chemistry Letters**, v.27, p.503-504, 1998.

YAMASHITA, K.; OKUYAMA, M.; WATANABE, Y.; HONMA, S.; KOBAYASHI, S.; NUMAZAWA, M. Highly sensitive determination of estrone and estradiol in human serum by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Steroids**, v. 72, p. 819–827, 2007.

YAN, W. *et al.* Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7539–7545, 2009.

YANG, C. *et al.* Voltammetric determination of estrone based on the enhancement effect of surfactant and a MWNT film electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 29. p. 1741–1745, 2009.

YARDIM, Y. *et al.* Voltammetric behavior of benzo[a]pyrene at boron-doped diamond electrode: a study of its determination by adsorptive transfer stripping voltammetry based on the enhancement effect of anionic surfactant, sodium dodecylsulfate. **Talanta**, p. 441-448, 2011.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormones steroids in environment. **Environment International**, New York, v. 28, p. 545-551, 2002.

YU, Y. WU, L. Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 89. p. 258– 263, 2012.

ZACHAREWSKI, T. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 613-623, 1997.

ZHANG, C. *et al.* Boron-doped diamond anodic oxidation of ethidium bromide: Process optimization by response surface methodology. **Electrochimica Acta**, v. 64, p. 100–109, 2012.

ZHANG, R.J.; LEE, S.T.; LAM, Y.W. Characterization of heavily boron-doped diamond films, **Diamond and Related Materials**, v.5, p.1288-1292, 1996.

ZHANG, Z. *et al.* Ionic liquid foam floatation coupled with solid phase extraction for separation and determination of hormones by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 704. p. 98– 109, 2011a.

ZHANG, Z. *et al.* Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 685. p. 29–35, 2011b.

ZOU, Y. *et al.* Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 421. p. 378–384, 2012.