



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO QUIMICAMENTE  
MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA  
DETERMINAÇÃO DE METILDOPA EM FÁRMACO**

**Aline Alves Freitas**

Área de concentração: Química Analítica  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC  
Fevereiro / 2017



ALINE ALVES FREITAS

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO QUIMICAMENTE  
MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA  
DETERMINAÇÃO DE METILDOPA EM FÁRMACO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC

2017

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

Freitas, Aline Alves

Desenvolvimento de eletrodo quimicamente  
modificado com nanopartículas de ouro para  
determinação de metildopa em fármaco / Aline  
Freitas ; orientador, Iolanda Cruz Vieira -  
Florianópolis SC, 2017.

90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e  
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Eletrodo quimicamente modificado.  
3. Nanopartículas de ouro. 4. Polímero. 5. Metildopa.  
I. Cruz Vieira, Iolanda. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Química. III. Título.

ALINE ALVES FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO QUIMICAMENTE  
MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA  
DETERMINAÇÃO DE METILDOPA EM FÁRMACO**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Título de Mestre em Química no Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 17 de fevereiro de 2017



**Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado**  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**



**Prof.ª Dr.ª Iolanda Cruz Vieira**  
Orientadora (DQ/UFSC)



**Prof. Dr. Eduardo Zapp**  
(DCCE/UFSC- Blumenau)



**Prof. Dr. Luiz Augusto S. Madureira**  
(DQ/UFSC)



**Prof. Dr. Luciano Vitali**  
(DQ/UFSC)



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela dádiva da vida;

Ao meu pai Oélio, que no curto espaço de tempo em que convivemos me deu seu amor incondicional, e me ensinou o respeito, a ética e principalmente, que o conhecimento é o nosso bem mais precioso;

A minha mãe Céris que, mais que uma mãe, foi um pai, uma amiga e o exemplo que pretendo seguir e honrar sempre;

A minhas irmãs: Elisianne, Graça e Tereza pelo apoio, carinho e suporte que me fizeram chegar até aqui;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Cruz Vieira pela orientação, incentivo e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos do Laboratório de Biossensores (LaBios) – Larissa, Nicole, Lucas, Stephani, Tânia, Ana, Alessandra – pelo apoio, companheirismo, momentos de descontração e pela amizade que espero levar comigo por toda a vida;

As minhas amigas Amanda, Renata e Ghislaine pelos bons momentos compartilhados e por me lembrarem a cada dia que a verdadeira amizade supera qualquer obstáculo;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação acadêmica;

A secretaria da PPGQMC pela disposição e ajuda sempre que requisitado;

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC), pelas análises de microscopia;

Aos professores: Dr. Eduardo Zapp, Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira e Dr. Luciano Vitali, por aceitarem participar da banca examinadora;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.



*“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: ele também é uma criança colocada diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas”.*

*(Marie Curie)*



## RESUMO

O presente trabalho disserta sobre o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados para a determinação de metildopa em amostra farmacêutica, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV). Os eletrodos de pasta de carbono (CPE) foram modificados com duas diferentes suspensões de nanopartículas de ouro (AuNP): a primeira estabilizada em dialdeído amídico (DAS), dando origem ao eletrodo quimicamente modificado CPE/DAS/AuNP, e a segunda estabilizada em polivinilpirrolidona (PVP) dando origem ao eletrodo CPE/PVP/AuNP. As nanopartículas foram sintetizadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os eletrodos foram caracterizados eletroquimicamente por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (CV). Sob as condições ótimas de trabalho estabelecidas (tampão McIlvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 3,5; 50 µL das suspensões DAS/AuNP e PVP/AuNP adicionadas a pasta), a curva de calibração apresentou uma faixa linear de 9,99x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> a 1,96x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> para os eletrodos quimicamente modificados, com limites de detecção de 5,04x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> e 4,69x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O eletrodo CPE/DAS/AuNP, por apresentar características mais vantajosas do que o CPE/PVP/AuNP (por exemplo, diminuição da resistência a transferência de elétrons e pré-concentração do analito na superfície do eletrodo), foi selecionado para aplicação na determinação de metildopa em amostra de comprimido comercial. O estudo de recuperação apresentou valores na faixa de 95,3 a 105,2 %. A concentração de MD obtida empregando o CPE/DAS/AuNP foi de 255,9 mg/comprimido, possuindo uma ótima correlação com o valor rotulado (erro relativo: 3,85%) e o método comparativo espectrofotométrico (erro relativo: 2,36%), recomendado pela Farmacopeia Brasileira. Portanto, o CPE/DAS/AuNP representa uma ferramenta útil para a detecção rápida e com exatidão adequada do teor de metildopa presente em fármacos.

**Palavras-Chave:** eletrodo quimicamente modificado, nanopartículas de ouro, dialdeído amídico, polivinilpirrolidona, metildopa.



## ABSTRACT

The present work discusses the development of chemically modified electrodes for the determination of methyl dopa in pharmaceutical sample, using the technique of square wave voltammetry (SWV). The carbon paste electrodes (CPE) were modified with two different suspensions of gold nanoparticles (AuNP): the first stabilized in dialdehyde amide (DAS), giving rise to the chemically modified electrode CPE/DAS/AuNP, and the second stabilized in polyvinylpyrrolidone (PVP) giving the CPE/PVP/AuNP electrode. The nanoparticles were synthesized and characterized by transmission electron microscopy (TEM). The electrodes were characterized electrochemically by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). Under the optimum working conditions (McIlvaine buffer  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 3.5,  $50 \mu\text{L}$  of the suspensions DAS/AuNP and PVP/AuNP added to the paste), the calibration curve presented a linear range of  $9.99 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  to  $1.96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  for chemically modified electrodes with detection limits of  $5.04 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  and  $4.69 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , respectively. The CPE/DAS/AuNP electrode, because it presented more advantageous characteristics than the CPE/PVP/AuNP (e.g. decrease in electron transfer resistance and pre-concentration of the analyte on the electrode surface), was selected for application in the determination of methyl dopa in commercial tablet sample. The recovery study presented values in the range of 95.3 to 105.2%. The MD concentration obtained using the CPE/DAS/AuNP was  $255.9 \text{ mg/tablet}$ , having an excellent correlation with the labeled value (relative error: 3.85%) and the comparative spectrophotometric method (relative error: 2.36%), recommended by the Brazilian Pharmacopoeia. Therefore, the CPE/DAS/AuNP represents an useful tool for the rapid and accurate detection of the content of methyl dopa present in drugs.

**Keywords:** chemically modified electrode. gold nanoparticles. dialdehyde starch. polyvinylpyrrolidone. methyl dopa.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Dependência do tamanho da superfície/fração de volume para nanopartículas esféricas.....	17
<b>Figura 2</b> Esquema de duas abordagens empregadas na fabricação de nanomateriais. ....	18
<b>Figura 3</b> Fotografias de suspensões aquosas de nanoesferas de ouro (painéis superiores) e nanobastões de ouro (painéis inferiores) em função de dimensões crescentes. São apresentadas imagens de microscopia eletrônica de transmissão correspondente das nanopartículas (barras na escala de 100 nm).....	20
<b>Figura 4</b> Estrutura química do DMSO. ....	21
<b>Figura 5</b> Representação dos modelos de estabilização de NPs: (A) estabilização eletrostática; (B) estérica e (C) eletroestérica. ....	22
<b>Figura 6</b> Estrutura química do polímero PVP. ....	23
<b>Figura 7</b> Estrutura química do polímero DAS.....	24
<b>Figura 8</b> Estrutura química da metildopa .....	26
<b>Figura 9</b> (A) Voltamogramas obtidos para os eletrodos modificados com as suspensões sintetizadas a partir de diferentes concentrações de H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> e NaBH <sub>4</sub> : AuNP/DAS (a) $3,84 \times 10^{-3} / 1,82 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , (b) $3,84 \times 10^{-3} / 2,61 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , (c) $3,84 \times 10^{-3} / 3,33 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> e (d) $1,96 \times 10^{-3} / 1,13 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> para MD ( $1,5 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> ). (B) Respostas relativas (%). (C) Voltamogramas obtidos para os eletrodos modificados com as suspensões sintetizadas a partir de diferentes concentrações de H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> e NaBH <sub>4</sub> : AuNP/PVP (a) $1,96 \times 10^{-3} / 1,13 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , (b) $3,84 \times 10^{-3} / 3,33 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , (c) $3,84 \times 10^{-3} / 1,82 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> e (d) $3,84 \times 10^{-3} / 2,61 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> para MD ( $1,5 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> ) em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 3,0) por SWV. (D) Respostas relativas (%). ....	38
<b>Figura 10</b> Imagens de TEM para: (A) DAS/AuNP e (C) PVP/AuNP. Diagrama com a distribuição de números de partículas por diâmetros (B) DAS/AuNP e (D) PVP/AuNP.....	40
<b>Figura 11</b> Representação esquemática da reação de oxirredução da MD na superfície dos CME: CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP..	41

**Figura 12** (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando solução tampão Mcllvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de MD, utilizando os eletrodos: (a) CPE; (b) CPE/DAS; e (c) CPE/DAS/AuNP. (B) Resposta relativa (%). (C) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando solução tampão Mcllvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de MD, utilizando os eletrodos: (a) CPE; (b) CPE/PVP; e (c) CPE/PVP/AuNP. (D) Resposta relativa (%). .....42

**Figura 13** (A) EIS para: (a) CPE/DAS/AuNP, (b) CPE/DAS e (c) CPE; (B) EIS para: (a) CPE/PVP/AuNP, (b) CPE/PVP e (c) CPE; em solução KCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>) contendo 10x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3/4-</sup>, circuito aberto, 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1-100000 Hz. ....44

**Figura 14** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 10,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para (A) CPE, (C) CPE/DAS/AuNP e (E) CPE/PVP/AuNP; e seus respectivos gráficos ip x v<sup>1/2</sup> (B) CPE, (D) CPE/DAS/AuNP e (F) CPE/PVP/AuNP.....46

**Figura 15** Gráficos de log ip vs. log v para (A) CPE/DAS/AuNP e (B) CPE/PVP/AuNP obtidos em solução KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 10,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.....47

**Figura 16** Voltamogramas cíclicos para (A) CPE/DAS/AuNP e (B) CPE/PVP//AuNP empregando MD 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em tampão Mcllvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup>. .....48

**Figura 17** Representação esquemática da reação de oxirredução da molécula de MD. ....48

**Figura 18** (A) Cronocoulometria realizada a 0,5 V com 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de metildopa em solução tampão Mcllvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,5, empregando (A): CPE (a) e CPE/DAS/AuNP (c) na ausência do analito e CPE (b) e CPE/DAS/AuNP (d) na presença do analito. (B) Gráficos de Anson feitos a partir dos dados obtidos das curvas Q vs. t. ....49

**Figura 19** (A) Cronocoulometria realizada a 0,5 V com 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de metildopa em solução tampão Mcllvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 3,5, empregando (A): CPE (a) e CPE/PVP/AuNP (c) na ausência do analito e CPE (b) e CPE/PVP/AuNP (d) na presença do analito. (B)

Gráficos de Anson feitos a partir dos dados obtidos das curvas Q vs. t.....	50
<b>Figura 20</b> Influência do volume das suspensões (A) DAS/AuNP e (B) PVP/AuNP adicionadas a pasta de carbono na resposta analítica dos CME, em solução tampão Mcllvaine (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 3,0) utilizando MD 1,5x10 <sup>-5</sup> molL <sup>-1</sup> .....	52
<b>Figura 21</b> (A): Voltamogramas de onda quadrada (frequência 50 Hz, amplitude de pulso 50 mV e incremento de potenciais de 5 mV) para CPE/DAS/AuNP, empregando MD 1,5 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> em tampão Mcllvaine 0,1 mol L <sup>-1</sup> : (a) pH 2,0; (b) pH 2,5; (c) pH 3,0; (d) pH 3,5; (e) pH 4,0; (f) 4,5 e (g) 5,0. (B) Gráfico de variação da corrente em função do pH e relação linear entre potencial e pH.....	54
<b>Figura 22</b> (A): Voltamogramas de onda quadrada (frequência 50 Hz, amplitude de pulso 50 mV e incremento de potenciais de 5 mV) para CPE/PVP/AuNP, empregando MD 1,5 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> em tampão Mcllvaine 0,1 mol L <sup>-1</sup> : (a) pH 2,0; (b) pH 2,5; (c) pH 3,0; (d) pH 3,5; (e) pH 4,0; (f) 4,5 e (g) 5,0. (B) Gráfico de variação da corrente em função do pH e relação linear entre potencial e pH.....	54
<b>Figura 23</b> (A): Voltamogramas do estudo da técnica voltamétrica a ser empregada: (a) LSV; (b) DPV; (c) SWV para (A) CPE/DAS/NPAu; e (C) CPE/PVP/NPAu; com MD na concentração de 1,5 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> em tampão Mcllvaine (0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 3,5). Gráficos da resposta relativa em corrente para cada técnica, (B) CPE/DAS/NPAu; e (D) CPE/PVP/NPAu. ....	55
<b>Figura 24</b> Estudo dos parâmetros da SWV (A) amplitude de pulso; (B) incremento de potencial e (C) frequência sobre a resposta analítica do eletrodo CPE/DAS/AuNP, utilizando MD 1,5x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> em solução tampão Mcllvaine (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 3,5).....	57
<b>Figura 25</b> Estudo dos parâmetros da SWV (A) amplitude de pulso; (B) incremento de potencial e (C) frequência sobre a resposta analítica do eletrodo CPE/PVP/AuNP, utilizando MD 1,5x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> em solução tampão Mcllvaine (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 3,5).....	58
<b>Figura 26</b> Voltamogramas de SWV obtidos utilizando (A) CPE/DAS/AuNP e (C) CPE/PVP/AuNP em solução tampão Mcllvaine (0,1 mol L <sup>-1</sup> ; pH 3,5) para MD, nas seguintes concentrações: (a) 9,99 x 10 <sup>-7</sup> ; (b) 1,99 x 10 <sup>-6</sup> ; (c) 2,99 x 10 <sup>-6</sup> ; (d)	

3,98 x 10<sup>-6</sup>; (e) 4,97 x 10<sup>-6</sup>; (f) 5,96 x 10<sup>-6</sup>; (g) 6,95 x 10<sup>-6</sup>; (h) 7,93 x 10<sup>-6</sup>; (i) 8,92 x 10<sup>-6</sup>; (j) 9,90 x 10<sup>-6</sup>; (k) 1,09 x 10<sup>-5</sup>; (l) 1,18 x 10<sup>-5</sup>; (m) 1,28 x 10<sup>-5</sup>; (n) 1,38 x 10<sup>-5</sup>; (o) 1,47 x 10<sup>-5</sup>; (p) 1,57 x 10<sup>-5</sup>; (q) 1,67 x 10<sup>-5</sup>; (r) 1,76 x 10<sup>-5</sup>; (s) 1,86 x 10<sup>-5</sup> e (t) 1,96 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>. Curvas de calibração para (B) CPE/DAS/AuNP e (D) CPE/PVP/AuNP. ....60

**Figura 27** (A) Voltamogramas de SWV obtidos utilizando CPE/DAS/AuNP, em tampão McIlvaine (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,5), e soluções de padrão MD nas seguintes concentrações: (a) 1,99 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>; (b) 3,98 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> e (c) 5,96 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (frequência de 50 Hz, amplitude de pulso de 60 mV e incremento de 10 mV) adicionadas sobre uma alíquota de 100 µL de amostra. (B) Curva de calibração por adição de padrão. ....66

**Figura 28** (A) Espectro de absorvância obtido da curva de MD, nas seguintes concentrações: (a) 1,58 x 10<sup>-4</sup>; (b) 2,37 x 10<sup>-4</sup>; (c) 3,16 x 10<sup>-4</sup>; (d) 3,94 x 10<sup>-4</sup> e (e) 4,73 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> por espectrofotometria Uv-Vis em comprimento de onda 520 nm. (B) Curva de calibração externa de MD. ....67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Equações da reta obtidas por meio dos experimentos de cronocoulometria.....	50
<b>Tabela 2</b> Parâmetros de otimização do método.....	59
<b>Tabela 3</b> Parâmetros das curvas de calibração, limites de detecção e quantificação. ....	62
<b>Tabela 4</b> Comparação de diferentes CME aplicados na determinação de MD.....	63
<b>Tabela 5</b> Estudos de recuperação para a MD em amostra farmacêutica utilizando o CPE/DAS/AuNP.....	65
<b>Tabela 6</b> Determinação de MD em amostra farmacêutica usando o CME proposto e o método comparativo.....	67



## LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

A - Ampère

A - Área superficial do eletrodo

AuNP – Nanopartículas de ouro (*gold nanoparticles*)

C - Concentração da espécie eletroativa

CME – Eletrodo quimicamente modificado (*chemically modified electrode*)

CPE – Eletrodo de pasta de carbono (*carbon paste electrode*)

CPE/DAS – Eletrodo de pasta de carbono modificado com dialdeído amídico

CPE/DAS/AuNP – Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em dialdeído amídico

CPE/PVP - Eletrodo de pasta de carbono modificado com polivinilpirrolidona

CPE/PVP/AuNP – Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em polivinilpirrolidona

CV – Voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*)

D - Coeficiente de difusão da espécie eletroativa

DAS – Dialdeído amídico (*dialdehyde starch*)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (*differential pulse voltammetry*)

E – Potencial elétrico

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode*)

<sup>1</sup>H-NMR – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (*proton nuclear magnetic resonance*)

$I_p$  - Corrente de pico

$I_{pa}$  - Corrente de pico anódica

$I_{pc}$  - Corrente de pico catódica

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada  
(*International Union of Pure Applied Chemistry*)

LOD – Limite de detecção (*limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (*limit of quantification*)

LSPR – Ressonância plasmônica de superfície localizada (*localized surface plasmon resonance*)

LSV – Voltametria de varredura linear (*linear sweep voltammetry*)

MD - Metildopa

$n$  – Número de elétrons transferidos na reação eletroquímica

NPs – Nanopartículas metálicas

PSA – Antígeno prostático específico (*prostate specific antigen*)

PVP – Polivinilpirrolidona (*polyvinylpyrrolidone*)

$R_{ct}$  – Resistência à transferência de carga (*charge-transfer resistance*)

RSD – Desvio-padrão relativo (*relative standard deviation*)

SWV – Voltametria de onda quadrada (*square-wave voltammetry*)

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy*)

UV-Vis – Espectroscopia de transmissão na região Ultravioleta-visível

$v$  - Velocidade de varredura

V – Volts

$Z'$  – Componente real da impedância

$Z''$  – Componente imaginária da impedância

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>15</b>
2.1	Eletrodo quimicamente modificado (CME) .....	15
2.2	Nanopartículas metálicas.....	17
2.2.1	Nanopartículas de ouro.....	19
2.3	Estabilização de nanopartículas.....	21
2.3.1	Polivinilpirrolidona .....	23
2.3.2	Dialdeído amídico .....	24
2.4	Uso de AuNP na construção de CME .....	24
2.5	Metildopa .....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1	Objetivo Geral .....	29
3.2	Objetivos Específicos .....	29
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>31</b>
4.1	Reagentes e soluções .....	31
4.2	Instrumentação .....	31
4.3	Metodologia.....	32
4.3.1	Síntese das nanopartículas de ouro.....	32
4.3.2	Construção do CME .....	33
4.3.3	Medidas eletroquímicas.....	33
4.3.4	Preparo da amostra e quantificação de MD.....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1	Otimização da síntese das AuNP.....	37
5.2	Caracterização das nanopartículas.....	38
5.3	Princípio de funcionamento dos CME .....	40
5.4	Estudo da contribuição dos modificadores.....	41

5.5	Caracterização eletroquímica dos CME .....	43
5.5.1	Impedância eletroquímica.....	43
5.5.2	Efeito da velocidade de varredura e estudo da área eletroativa dos eletrodos .....	44
5.5.3	Estudo da reversibilidade do sistema.....	47
5.5.4	Cronocoulometria .....	48
5.6	Otimização do método.....	51
5.6.1	Efeito do volume das suspensões DAS/AuNP e PVP/AuNP adicionadas aos eletrodos.....	51
5.6.2	Estudo da natureza do eletrólito de suporte e pH .....	52
5.6.3	Escolha da técnica voltamétrica e otimização dos parâmetros .....	54
5.7	Desempenho analíticos dos CME.....	59
5.7.1	Curva de calibração externa.....	59
5.7.2	Estudo da repetibilidade entre medidas e entre eletrodos.....	63
5.8	Aplicação do CPE/DAS/AuNP.....	64
5.8.1	Estudos de recuperação.....	64
5.8.2	Determinação de MD em fármaco.....	65
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica, para zelar pela qualidade e segurança dos medicamentos destinados à população, deve possuir um controle de qualidade eficiente, que compreende desde a matéria-prima utilizada na fabricação até o produto final. Neste contexto, a análise de medicamentos é um procedimento realizado com frequência na rotina dos laboratórios, sendo de grande interesse o desenvolvimento de novos métodos de análise cada vez mais rápidos e que apresentem boa sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo de implementação e manutenção.

Dentre as diversas técnicas utilizadas atualmente para a determinação de fármacos, como, por exemplo, técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, as técnicas eletroanalíticas vêm ganhando destaque principalmente com relação ao desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados (CME). Estes eletrodos podem ser utilizados na análise de diversos tipos de analito devido à incorporação de modificadores que os tornam sensíveis e/ou seletivos a uma gama de compostos. As características dos CMEs dependem de dois parâmetros: o eletrodo base e sua modificação. O eletrodo base pode ser de diversos tipos, por exemplo, eletrodos sólidos como carbono vítreo, ouro, diamante dopado com boro ou eletrodo de pasta de carbono (CPE).

O CPE além de permitir a modificação interna do material eletródico, não apenas a superfície, como nos eletrodos sólidos, também apresenta baixo custo e fácil construção. Os modificadores empregados podem ser enzimas, complexos inorgânicos ou nanomateriais como, por exemplo, nanopartículas metálicas (NP). As NP são empregadas em CME, por aliarem suas propriedades condutoras ao ganho na área superficial devido sua escala nanométrica. Para manter a estabilidade das NP em longo prazo utilizam-se compostos chamados estabilizantes, que podem ser, por exemplo, surfactantes, líquidos iônicos ou polímeros. Os polímeros, além de ser uma opção de baixo custo, conseguem impedir a coalescência das partículas através do impedimento estérico promovido por suas longas cadeias orgânicas.

Nesse sentido, este trabalho pretende utilizar um CME baseado na modificação da pasta de carbono com AuNP estabilizadas em polímero dialdeído amídico (CPE/DAS/AuNP) e um CME modificado com AuNP estabilizadas em polivinilpirrolidona (CPE/PVP/AuNP) para determinação de metildopa em amostra farmacêutica.



## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Eletrodo quimicamente modificado (CME)

Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram no início da década de 70. Até então só eram utilizados eletrodos de materiais tais como carbono, ouro, platina e mercúrio. O primeiro exemplo da modificação da superfície de um eletrodo foi o trabalho de Lane e Hubbard (LANE, HUBBARD, 1973). Estes pesquisadores modificaram um eletrodo de platina com compostos quelatos de cadeias laterais olefínicas, com o objetivo de promover a quimissorção seletiva de metais na superfície do eletrodo. Somente alguns anos mais tarde, em 1975, o termo eletrodo quimicamente modificado foi introduzido no vocabulário eletroquímico por Murray e colaboradores (MOSES *et al.*, 1975).

Um eletrodo quimicamente modificado (do inglês *chemically modified electrode* - CME) é um dispositivo construído a partir de um material condutor ou semicondutor com espécies quimicamente ativas, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução (DURST, 1997, MOSES *et al.*, 1975). A modificação da composição do eletrodo visa melhorar a sensibilidade e/ou a seletividade, permitindo melhorar a resposta obtida com relação ao analito de interesse. O CME possui diversas aplicabilidades, dentre elas destacam-se interações seletivas e pré-concentração de um analito na superfície modificada do eletrodo, eletrocatalise de reações redox de um analito com transferência lenta de elétrons sobre o eletrodo base, seletividade com uso de membranas para inibir possíveis interferentes, detecção eletroquímica de analitos iônicos e incorporação de biomoléculas (PEREIRA *et al.*, 2002). Esta capacidade de modificação da composição e superfície de um eletrodo levou a uma gama de aplicações analíticas dos CME e criou novas perspectivas para a eletroanálise (RADI, 2010).

A escolha do material para o eletrodo base é um aspecto muito importante da preparação de um CME. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas como manter uma resposta estável e reprodutiva, não apresentar degradação, e não sofrer reações de oxirredução que possam alterar a sua estrutura bem como o resultado obtido na análise (PEREIRA *et al.*, 2002). Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras e pasta de carbono, sendo este último uma

excelente alternativa, pois possui a vantagem de possibilitar a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores e estabilizadores, entre outros (ŠVANCARA *et al.*, 2001).

De forma geral, são utilizados quatro métodos para a introdução de um agente modificador no eletrodo base (DURST, 1997, PEREIRA *et al.*, 2002):

- **Quimissorção:** resulta da formação de ligações químicas entre o adsorvente e o adsorvido em uma monocamada. Esta abordagem geralmente produz um filme forte e, idealmente, irreversivelmente adsorvido na superfície do eletrodo;
- **Ligação covalente:** incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo;
- **Filmes poliméricos:** filmes condutores e não-condutores são mantidos na superfície do eletrodo por alguma combinação de adsorção e baixa solubilidade na solução de contato, ou por ancoragem física num eletrodo poroso. A película de polímero pode ser orgânica, organometálica ou inorgânica podendo já conter o modificador químico desejado ou esse produto químico pode ser adicionado ao polímero num segundo passo de funcionalização;
- **Materiais compósitos:** são formados pela combinação de dois ou mais componentes de diferente natureza. Cada componente mantém suas características individuais, mas a mistura pode apresentar novas características físicas, químicas ou biológicas. Materiais à base de carbono formam compósitos condutores, o que os torna muito empregados em CME. O exemplo mais comum é a modificação do CPE.

A utilização de CME é uma área em franca expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais empregados em análises com fins analíticos de quantificação. Com a evolução do CME cada vez mais tipos de modificadores foram surgindo, desde a imobilização de grupos funcionais e catalisadores na década de 60 até as modificações mais recentes com filmes poliméricos, matrizes

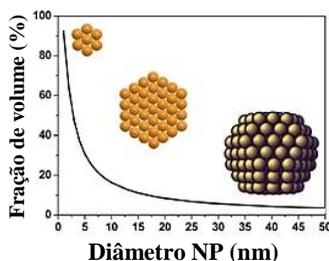
inorgânicas (sílica), membranas biológicas e nanomaterias, como no caso das nanopartículas metálicas (PEREIRA *et al.*, 2002).

## 2.2 Nanopartículas metálicas

Com os recentes avanços em ciência e tecnologia em nanoescala, as nanopartículas metálicas vêm ganhando destaque como uma excelente alternativa de modificação, mantendo sua atividade catalítica e aumentando significativamente a quantidade de biomoléculas imobilizadas sobre a superfície do eletrodo. As NPs são partículas microscópicas cujo tamanho é medido em nanômetros, frequentemente restrito às chamadas partículas nanométricas (NPs < 100 nm de diâmetro) e estão entre as nanoestruturas mais estudadas e aplicadas em diversas áreas tais como catálise (PRIECEL *et al.*, 2016), biorremediação (CECCHIN *et al.*), medicina (Saxena and Singh, 2017) e sensores eletroquímicos (ENSAFI *et al.*, 2017, ARÉVALO *et al.*, 2017). Suas propriedades ópticas, elétricas e magnéticas são influenciadas por sua grande área superficial, alta energia superficial e tamanho relativamente pequeno (DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2016).

A origem da dependência do tamanho com as propriedades dos nanomateriais pode ser relacionada a dois efeitos fundamentais: a fração de átomos na superfície, que aumenta com o decréscimo do tamanho (Figura 1), e se torna significativamente maior em nanopartículas; e as dimensões limitadas da nanopartícula que leva a efeitos de confinamento espacial que afetam o material levando a alteração, por exemplo, de suas propriedades ópticas e magnéticas (DONEGÁ, 2014).

**Figura 1** Dependência do tamanho da superfície/fração de volume para nanopartículas esféricas.



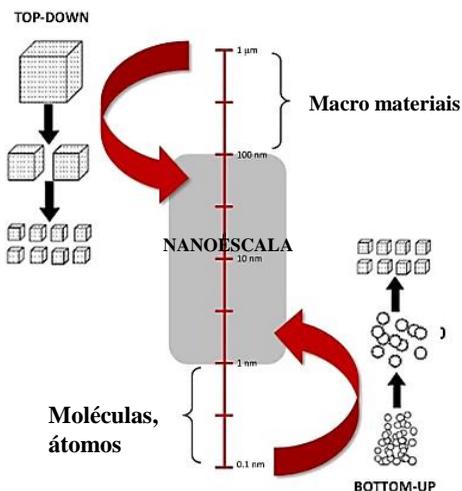
**Fonte:** adaptado de (DONEGÁ, 2014)

As características dos nanomateriais são determinadas, em grande parte, pelas condições de sua preparação. Os métodos de síntese de nanopartículas podem ser classificados em dois tipos (DONEGÁ, 2014, LÓPEZ-LORENTE; VALCÁRCEL, 2014):

- **Processo top-down**, no qual o material é removido de um objeto em larga escala para criar nanoestruturas. O material pode ser quebrado subsequentemente em partículas menores até que a escala nanométrica seja alcançada. Este processo é largamente utilizado na fabricação de nanomateriais na forma de pó.
- **Processo bottom-up**, no qual blocos de construção (átomos, moléculas) são montados em estruturas progressivamente maiores até que a nanoescala seja obtida. Este procedimento pode ser executado de diversas maneiras podendo resultar em diferentes nanomateriais.

Os dois processos de síntese descritos acima podem ser visualizados na Figura 2.

**Figura 2** Esquema de duas abordagens empregadas na fabricação de nanomateriais.



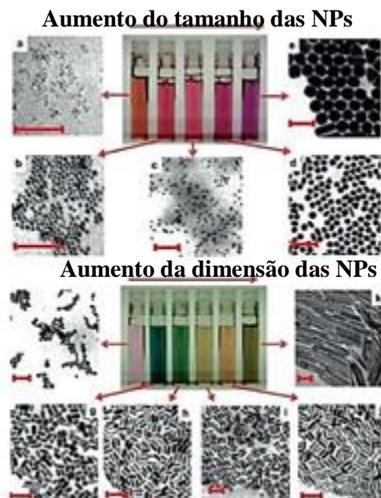
**Fonte:** adaptado de (LÓPEZ-LORENTE, VALCÁRCEL, 2014).

### 2.2.1 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNP) têm uma rica história em Química, que remonta à época da Roma antiga, onde foram usadas para colorir lentes para fins decorativos. A era moderna da síntese de AuNP começou há mais de 150 anos com o trabalho de Michael Faraday (1850), que possivelmente foi o primeiro a observar que as soluções de ouro coloidal têm propriedades que diferem do ouro metálico. Métodos flexíveis e de alto rendimento para a síntese destas nanopartículas foram desenvolvidas ao longo do último meio século (GILJOHANN *et al.*, 2010).

As AuNP podem ser facilmente modificadas com ligantes contendo grupos funcionais tais como tióis, fosfinas e aminas que exibem afinidade para superfícies de ouro. A solução coloidal de ouro possui coloração vermelha intensa (para partículas menores que 100 nm) ou coloração amarelada escura (para partículas maiores). Estas propriedades ópticas interessantes das AuNP são devidas à sua interação única com a luz (AMENDOLA *et al.*, 2014). Na presença do campo eletromagnético oscilante da luz, os elétrons livres das AuNP sofrem uma oscilação em relação à rede metálica. Este processo é ressonante a uma frequência particular da luz e é designado por ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). Após a absorção, o plasmon de superfície decai radiativamente resultando em dispersão de luz convertendo a luz absorvida em calor (MODY *et al.*, 2010, JAIN *et al.*, 2006). A Figura 3 mostra os diferentes tipos de coloração das suspensões coloidais de ouro conforme o aumento do tamanho da nanopartícula e de suas dimensões.

**Figura 3** Fotografias de suspensões aquosas de nanoesferas de ouro (painéis superiores) e nanobastões de ouro (painéis inferiores) em função de dimensões crescentes. São apresentadas imagens de microscopia eletrônica de transmissão correspondente das nanopartículas (barras na escala de 100 nm).



**Fonte:** adaptado de (MODY *et al.*, 2010)

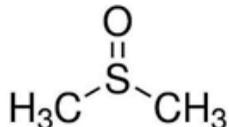
O método predominante para a síntese de AuNP esféricas monodispersas foi iniciado por Turkevich e colaboradores (TURKEVICH *et al.*, 1951) em 1951 e mais tarde refinado por Frens e colaboradores (FRENS; KOLLOID, 1973). Este método utiliza a redução química de sais de ouro, tais como o ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ), em meio aquoso, utilizando citrato como agente redutor e produz AuNP esféricas monodispersas na gama de 10-20 nm de diâmetro (CHENG *et al.*, 2014). Contudo, a síntese de AuNP maiores com diâmetros entre 30 e 100 nm foi relatada por Brown e Natan através da sementeira de  $\text{Au}^{3+}$  pela hidroxilamina. Pesquisas subsequentes levaram à modificação da forma dessas nanopartículas, resultando em bastões, prismas, e partículas esféricas (LU *et al.*, 2008).

Diversos métodos de síntese de NPs têm surgido com o intuito de controlar o tamanho das partículas obtidas e melhorar propriedades como estabilidade e dispersão. Dentre eles, a síntese de NPs em meio orgânico tem sido empregada, utilizando estes solventes como meio reacional com intuito de obter NP de dimensões reduzidas e dispersão uniforme. Por exemplo, rotas alternativas foram projetadas com base na transferência de AuNP obtidas em uma solução aquosa para uma fase

orgânica usando surfactantes, entre outras moléculas (KARG *et al.*, 2011, ABSALAN *et al.*, 2015). Além disso, espera-se que o uso de solventes orgânicos ajude a sintonizar as interações entre as NPs e os agentes estabilizantes para produzir interessantes propriedades físico-químicas e de reatividade, que são altamente relevantes na ciência da catálise. Dentre os solventes orgânicos mais utilizados neste tipo de síntese podemos destacar o dimetilsulfóxido (DMSO) (SALDÍAS *et al.*, 2015).

O DMSO (Figura 4) é um solvente aprótico polar, possuindo uma constante dielétrica de 46,7, que é suficientemente elevada para a separação de carga. Como resultado, é um solvente favorável para sólidos iônicos e moléculas polarizáveis. Além disso, é de baixo custo, biodegradável e inodoro, e tem baixa toxicidade e baixo risco ambiental. Seu ponto de ebulição elevado (189 °C) e a baixa pressão de vapor (0,0556 mbar a 20 °C) minimizam muito a emissão de solventes para a atmosfera. Foi designada pela indústria farmacêutica como um solvente de classe III, a classe de toxicidade mais baixa para os seres humanos, sem limites de exposição (SALDÍAS *et al.*, 2015)

**Figura 4** Estrutura química do DMSO.



A capacidade do DMSO para penetrar facilmente nas membranas biológicas pode permitir que as AuNP associadas a DMSO sejam facilmente integradas em sistemas biologicamente relevantes para potenciais aplicações biomédicas e farmacêuticas. Com o intuito de agregar as possíveis vantagens do meio orgânico na estabilização de NPs, foi desenvolvido neste trabalho a síntese de AuNP estabilizadas em polímeros dispersos em DMSO.

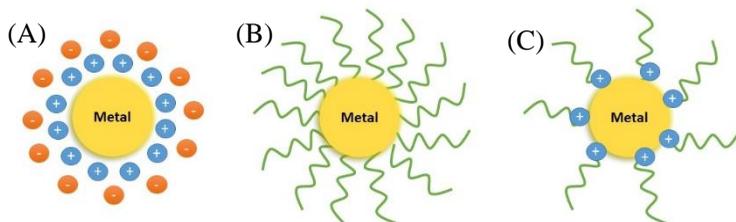
### 2.3 Estabilização de nanopartículas

Em geral, as suspensões de AuNP quando bem dispersas na superfície do eletrodo fornecem locais mais ativos para ligação de biomoléculas e melhoram a eficiência de transferência de elétrons. No entanto, as AuNP são propensas a sofrer coalescência em condições de preparo e aplicação, pois possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a sua imediata agregação para a

formação de ligações metal-metal (formação de clusters). Portanto, é um grande desafio explorar novas estratégias (materiais ou abordagens) para estabilizar AuNP, aumentando sua vida útil e melhorando o desempenho dos eletrodos quimicamente modificados com este nanomaterial (XU *et al.*, 2017)

Para evitar a agregação das nanopartículas, a preparação de sistemas coloidais geralmente é feita em presença de espécies denominadas estabilizadores, que se adsorvem sobre as superfícies das nanopartículas, formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência (MELO JR. *et al.*, 2012). Há três métodos principais de estabilização de NPs: repulsão eletrostática (estabilização eletrostática), impedimento estérico (estabilização estérica) e a combinação desses dois tipos de estabilização (estabilização eletroestérica). A Figura 5 mostra os três tipos de estabilização. A primeira (Figura 5 (A)) baseia-se na geração de forças de repulsão eletrostática entre partículas que se repelem mutuamente estabelecendo um revestimento carregado na superfície das partículas. A segunda estratégia (Figura 5 (B)) faz uso de compostos volumosos não iônicos, como polímeros ou dendrímeros, que geram repulsões entre partículas formando um revestimento estericamente impedido que circunda a superfície das nanopartículas. O terceiro tipo de estabilização (Figura 5 (C)), chamada eletroestérica, ocorre quando se utiliza um polieletrólito, pois este possui uma longa cadeia orgânica que promove o efeito estérico bem como uma parte da molécula carregada promovendo uma repulsão eletrostática (TRIVINHO-STRIXINO *et al.*, 2015).

**Figura 5** Representação dos modelos de estabilização de NPs: (A) estabilização eletrostática; (B) estérica e (C) eletroestérica.



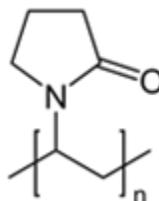
Há na literatura diversos exemplos de compostos empregados como agente estabilizante, com intuito de aumentar a estabilidade das NPs. Anteriormente, eram compostos orgânicos de baixa massa molecular (ácidos carbônicos, álcoois, amidas) e polímeros naturais (gelatina, goma arábica, ágar-ágar, amido, celulose, entre outros), e

atualmente utilizam-se mais frequentemente polímeros sintéticos (DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2016). A estabilização de NPs por compostos de alta massa molecular apresenta um grande ramo da moderna ciência coloidal de polímeros, que estuda regularidades de geração de sistemas dispersos com interfaces altamente desenvolvidas, e sua estabilidade cinética e de agregação (2005). Dentre os polímeros convencionais, a síntese de nanopartículas em biopolímeros tem atraído grande interesse devido as suas características como origem natural, não toxicidade, biodegradabilidade e versatilidade na funcionalização (DÍAZ-CRUZ *et al.*, 2016). Alguns exemplos de polímeros biodegradáveis utilizados como estabilizantes são a polivinilpirrolidona e o dialdeído amídico.

### 2.3.1 Polivinilpirrolidona

O polímero polivinilpirrolidona (PVP), representado na Figura 6, é um dos biomateriais mais utilizados industrialmente sendo utilizado em fármacos (carreamento de medicamentos), tintas de impressora, soluções para lentes de contato, membranas para diálise entre outros. É considerado um polímero sintético não-tóxico, uma vez que não é absorvido no trato gastrointestinal ou membranas mucosas. Além disso, não provoca efeito irritante (reações cutâneas e/ou respiratórias) (LEE, 2005).

**Figura 6** Estrutura química do polímero PVP.

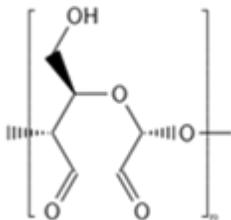


A PVP é utilizada como agente estabilizante em síntese de NP por possuir em sua estrutura sítios básicos de Lewis com alta afinidade pelas NP e cadeias orgânicas suficientemente compridas que criam um impedimento estérico, evitando a coalescência (MELO JR. *et al.*, 2012). Também possui propriedades físicas e químicas únicas, particularmente devido à sua boa solubilidade tanto na água como em solventes orgânicos (afinidade com substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas), e estabilidade química.

### 2.3.2 Dialdeído amídico

O polímero dialdeído amídico (DAS) é um tipo de amido modificado produzido pela oxidação de amido de milho nativo com periodato. A reação de oxidação é altamente específica, com o ácido periódico clivando a ligação entre C2 e C3 do anel glucopiranosose. Esta clivagem da ligação gera um grupo aldeído em cada um dos dois carbonos (Figura 7) (SPENCE *et al.*, 1995). O polímero DAS mantém uma excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, semelhante ao amido, e possui também melhor reatividade com outros grupos funcionais, como os grupos hidroxila ou amino em condições suaves. Desta forma, o DAS pode ligar grupos aminos em tecidos biológicos a partir de grupos formaldeídos reativos para formar uma estrutura de reticulação estável. Atualmente, com base na capacidade de reticulação efetiva, o DAS tem sido utilizado em indústrias de couro, aplicações de fármacos e biomateriais para implantação (WANG *et al.*, 2015).

**Figura 7** Estrutura química do polímero DAS.



### 2.4 Uso de AuNP na construção de CME

Zhao e colaboradores desenvolveram um sensor eletroquímico para a determinação de bisfenol A (BPA) empregando um filme de AuNP na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) por método de eletrodeposição. O sensor foi aplicado com sucesso para determinar BPA em amostras de extrato de plásticos e solo por voltametria de varredura linear. Sob condições ótimas, as correntes de pico de oxidação de BPA exibiram uma faixa linear, em relação à concentração de BPA, de  $1,5 \times 10^{-8}$  a  $5,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de  $1,1 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> e um coeficiente de correlação de 0,9996 (ZHAO *et al.*, 2017).

Kavosi e colaboradores construíram um imunossensor a partir da modificação de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com filme de

óxido de grafeno/quitosana ligado covalentemente ao anticorpo monoclonal do antígeno prostático específico (PSA) e de tionina como sonda redox sobre a superfície do eletrodo modificado. Para melhorar a sensibilidade, utilizaram-se AuNP encapsuladas em dendrímeros de poliamidoamina (AuNP-PAMAM) para ligação covalente do aptâmero de PSA como marcador eletroquímico no formato sanduíche. Sob condição otimizada, o limite de detecção obtido e a faixa de concentração linear foram de  $10 \text{ fg mL}^{-1}$  e  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $90 \text{ ng mL}^{-1}$  respectivamente, usando DPV. O imunossensor foi testado em amostras reais de soro humano e células cancerosas (KAVOSI *et al.*, 2015).

Rosy e Goyal desenvolveram um sensor a partir da modificação de um GCE com AuNP decoradas com polimelamina, eletropolimerizada, para determinação de domperidona (DOM). O sensor modificado foi testado através de medidas por SWV e mostrou uma resposta sensível, estável e linear na faixa de concentração de  $0,05\text{-}100 \text{ }\mu\text{M}$  com um limite de detecção de  $6 \text{ nM}$ . A seletividade do sensor proposto foi avaliada na presença de elevada concentração das principais moléculas interferentes como xantina, hipoxantina e ácido úrico. A aplicação analítica do sensor para a quantificação de DOM em fluidos biológicos como urina e soro também foi investigada e os resultados demonstraram uma recuperação  $> 95\%$  com  $\text{RSD} < 5\%$  (ROSY, GOYAL, 2015).

Afzali e colaboradores utilizaram um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado com AuNP como um sensor eletroquímico sensível para determinação de eugenol. A técnica DPV foi empregada para estudar o comportamento deste sobre o eletrodo modificado. O eletrodo proposto mostrou boa resposta de oxidação para o analito em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 8) e o potencial de pico foi cerca de  $+ 285 \text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag} / \text{AgCl}$ ). A corrente de pico aumentou linearmente com a concentração na faixa de  $5\text{-}250 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . O limite de detecção para o sensor foi de  $2,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  com desvio padrão relativo de  $1,2\%$ . O método foi aplicado à determinação de eugenol em amostras de água de rosas e os valores de recuperação foram na faixa de  $96\% - 99\%$  (AFZALI *et al.*, 2014).

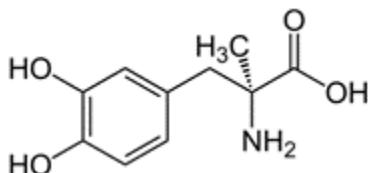
Outro ramo de aplicação dos CME modificados com AuNP, que vem se destacando nas últimas décadas é o controle de qualidade de fármacos. Análises químicas visando avaliar a composição de medicamentos, com o intuito de verificar as quantidades dos princípios ativos, assim como possíveis impurezas, são de suma importância, já que concentrações diferentes daquelas recomendadas podem causar múltiplos efeitos, podendo estes ser extremamente prejudiciais à saúde

da pessoa que está ingerindo o medicamento. Esse controle é ainda mais necessário com relação a medicamentos de uso controlado utilizados no tratamento de doenças que acometem grande parte da população como, por exemplo, a hipertensão (SILVA; SALLES; PAIXÃO, 2015). O uso de CME para controle de qualidade de medicamentos anti-hipertensivos atualmente tem como foco a análise de fármacos que fazem parte da Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde, que lista os medicamentos que satisfazem às necessidades de saúde prioritárias da população, os quais devem estar acessíveis em todos os momentos, na dose apropriada, e a todos os segmentos da sociedade (WHO, 2015). Dentre eles podemos destacar o propranolol, captopril, maleato de enalapril e metildopa, sendo este último utilizado em casos especiais como na hipertensão durante a gravidez (pré-eclâmpsia) (ENSAFI *et al.*, 2015).

## 2.5 Metildopa

A metildopa (MD), (*S*)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metil-ácido propanoico, Figura 8, é um derivado do catecol e um agente anti-hipertensivo (GHOLIVAND, AMIRI, 2013). É um inibidor da enzima descarboxilase em animais e no homem. Embora o mecanismo de ação ainda não tenha sido demonstrado de forma conclusiva, o seu efeito anti-hipertensivo provavelmente é devido ao seu metabolismo para alfa metilnorepinefrina, que então reduz a pressão arterial por estimulação de receptores alfa-adrenérgicos inibidores centrais. Foi demonstrado que a MD causa uma redução líquida na concentração tecidual de serotonina, dopamina, norepinefrina e epinefrina relaxando (alargamento) os vasos sanguíneos. Isso reduz a pressão arterial e permite que o sangue e o oxigênio circulem mais livremente em torno do corpo (MOLAAKBARI *et al.*, 2014).

**Figura 8** Estrutura química da metildopa



A MD, descoberta em 1960, é utilizada em medicamentos fornecidos como comprimidos, para uso oral, em três concentrações:

125 mg, 250 mg ou 500 mg por comprimido. Uma vez que não reduz o fluxo sanguíneo uterino ou prejudica o feto, é a droga de escolha para o tratamento da pré-eclâmpsia e também para a insuficiência renal (ENSAFI *et al.*, 2015). A concentração terapêutica de MD em plasma humano é, geralmente, na faixa de 0,1 a 0,5 mg L<sup>-1</sup> e seu tempo médio de meia vida no organismo é de 2 horas.

A necessidade de estudos clínicos e farmacocinéticos motiva o desenvolvimento de métodos analíticos simples, baixo custo e sensíveis para a determinação de fármacos nas suas diferentes formas de apresentação, tais como cápsulas, injeção ou creme. Vários métodos analíticos têm sido relatados para a análise de MD em produtos farmacêuticos ou fluídos biológicos. Dentre estes incluem-se métodos empregando fluorescência (KIM AND KODA, 1977), cromatografia (Li *et al.*, 2010), espectrofotometria (GADKARIEM *et al.*, 2009), e <sup>1</sup>H-NMR (TALEBPOUR *et al.*, 2004). No entanto, estes métodos apresentam algumas desvantagens que incluem custos elevados, tempos longos de análises e necessidade de pré-tratamento de amostras. Por outro lado, os métodos eletroquímicos têm atraído grande interesse devido à sua simplicidade, rapidez e elevada sensibilidade na detecção de MD sem requerer pré-tratamento da amostra (FOULADGAR, KARIMI-MALEH, 2013, KUTLUAY, ASLANOGLU, 2016, RAMÍREZ *et al.*, 2016).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a aplicabilidade do polímero dialdeído amídico (DAS) e polivinilpirrolidona (PVP) como agentes estabilizantes na síntese de nanopartículas de ouro (AuNP). Desenvolver CME a partir da modificação da pasta carbono com suspensão de AuNP estabilizadas em DAS e PVP, aplicando-os na determinação de MD em amostra farmacêutica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Otimizar a síntese de AuNP em ambos os polímeros (DAS e PVP);
- Caracterizar as DAS/AuNP e PVP/AuNP por TEM;
- Construir CME a partir da modificação de CPE com DAS/AuNP e PVP/AuNP;
- Avaliar a contribuição de cada modificador, separadamente, na resposta analítica da MD bem como suas proporções na construção dos CME;
- Caracterizar eletroquimicamente CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP por EIS e CV;
- Avaliar a influência do eletrólito de suporte e otimizar o pH do meio reacional;
- Estudar o desempenho das técnicas voltamétricas: voltametria de varredura linear, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial, e otimizar os parâmetros experimentais da técnica escolhida;
- Avaliar a repetibilidade entre medidas e entre eletrodos;
- Construir curvas de calibração externa para a MD com ambos os CME e determinar os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ);
- Aplicar o CME proposto na determinação de MD em matriz farmacêutica, bem como realizar estudos de recuperação, usando SWV;
- Comparar o teor de MD determinado na amostra pelo método proposto empregando o CPE/DAS/AuNP em relação ao método espectrofotométrico recomendado pela Farmacopeia Brasileira.



## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e soluções

Para construção dos CME à base de pasta de carbono foi usado pó de grafite (Acheson 38) da Fisher Scientific e Nujol (óleo mineral purificado) obtido da Aldrich.

A solução de dialdeído amídico (DAS) 0,25% (m/v) foi preparada pela dissolução de 0,25 g de DAS (Vetec) em 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de polivinilpirrolidona (PVP) 0,25% (m/v) foi preparada pela dissolução de 0,25 g de PVP (Aldrich) em 100 mL de DMSO. As soluções utilizadas no estudo do eletrólito suporte foram preparadas da seguinte forma: solução tampão McIvaine ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,5) foi preparada a partir de 0,18 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (NEON) e 0,26 g de  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_7$  (Sigma-Aldrich) em 25 mL de água; solução tampão Clark-Lubs ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 2,5) foi preparada utilizando 0,74 g de KCl e 0,02 mL de HCl em 50 mL de água; soluções HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparadas diluindo 0,15 e 0,26 mL dos ácidos concentrados, respectivamente, em 50 mL de água. A solução padrão de MD  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pesando-se 2,40 mg do reagente, diluindo com água em balão de 10 mL. A solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pesando-se 0,16 g de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  e 0,18 g de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , diluindo com água em um balão de 50 mL. Todas as soluções foram preparadas usando-se água purificada em sistema Milli-Q.

### 4.2 Instrumentação

As medidas de pH foram realizadas empregando um pHmetro da Micronal modelo B-475 com um eletrodo de vidro combinado. As análises espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Agilent G6860A Cary 60 UV-Vis com uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm).

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101, conectado a um computador (contendo o software de processamento de dados NOVA, versão 1.10). As análises voltamétricas foram realizadas em um sistema contendo três eletrodos, acoplado a uma célula de vidro com capacidade para 15,0 mL. Como eletrodo de trabalho foram utilizados o CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, como contra-eletrodo uma placa de platina ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) e como referência um eletrodo de Ag/AgCl (KCl,

3,0 mol L<sup>-1</sup>). Foi utilizado um agitador magnético da marca HI 190M (HANNA instruments) para auxiliar na homogeneização da solução de medida. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C).

Os experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT128N (Eco Chemie) sendo o software Nova 1.10 utilizado para coletar e tratar os dados obtidos. Os experimentos de cronocoulometria foram realizados com o mesmo aparelho, porém, o software utilizado para a coleta dos dados foi o General Purpose Electrochemical System (GPES) 4.9.

### 4.3 Metodologia

#### 4.3.1 Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNP) foram obtidas usando os polímeros DAS ou PVP como estabilizantes em DMSO contendo o metal de interesse (HAuCl<sub>4</sub>). Em 10,0 mL de solução de DAS ou PVP (0,25% m/m) em DMSO foram adicionados 200 µL da solução aquosa contendo o ácido cloroáurico, HAuCl<sub>4</sub> na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> e em seguida esta solução ficou sob agitação durante 10 min em temperatura ambiente (≈ 25 °C). Depois deste tempo, foram adicionados à solução 400 µL de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) 0,02 mol L<sup>-1</sup> recentemente preparada sob agitação constante durante mais 30 minutos. A solução inicialmente amarela passou a exibir uma coloração roxa para a AuNP estabilizada em DAS, e vermelha para a AuNP estabilizada em PVP, indicando que houve a formação das nanopartículas (SEOUDI *et al.*, 2010).

Para a caracterização das AuNP, em DAS e PVP, foram feitas imagens por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) realizadas em um microscópio JEOL JEM-1011 localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). O preparo da amostra para a análise foi realizado depositando-se uma alíquota da suspensão em um grid de cobre recoberto com carbono. A contagem das nanopartículas foi feita utilizando o software ImageJ e o tratamento dos dados foi realizado com o software Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation).

### 4.3.2 Construção do CME

Primeiramente, 120 mg de pó de grafite (60%, em massa) e 30  $\mu\text{L}$  de Nujol (15%, em volume) foram homogeneizados durante 10 min, com o auxílio de um almofariz e um pistilo. Subsequentemente, 50  $\mu\text{L}$  de solução DAS/AuNP (25%, em volume), foram adicionados à mistura, que foi então homogeneizada durante mais 15 min. Após a homogeneização completa, a pasta obtida foi compactada em uma seringa de plástico (capacidade: 1 mL; diâmetro interno: 1,0 mm). Finalmente, um fio de cobre (dimensões: 0,4 cm x 10,0 cm) foi inserido para obter o contato elétrico, e o CME foi então utilizado como o eletrodo de trabalho.

Para fins comparativos, um CME contendo PVP/AuNP foi preparado seguindo os mesmos procedimentos. Um CPE não modificado foi preparado de modo semelhante a partir da mistura de 120 mg de pó de grafite e 30  $\mu\text{L}$  de Nujol.

### 4.3.3 Medidas eletroquímicas

Os experimentos voltamétricos foram realizados à temperatura ambiente (25 °C) em uma célula eletroquímica contendo 10,0 mL do eletrólito de suporte (tampão McIlvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 3,5) e o volume requerido da substância analisada (solução padrão ou amostra farmacêutica). Os voltamogramas foram registrados após agitação magnética durante 60 segundos, tempo necessário para a homogeneização da solução na célula. Todas as medidas de potencial foram obtidas vs. Ag/AgCl (KCl, 3,0 mol L<sup>-1</sup>). As experiências de SWV foram realizadas em intervalo de potencial de + 0,2 a + 0,6 V, com frequência de 10 - 100 Hz, amplitude de 10 - 100 mV e incremento de varredura de 1 - 10 mV, após sucessivas adições de analito com auxílio de uma micropipeta. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em intervalo de potencial de - 0,2 a + 0,6 V, com velocidade de varredura entre 10 - 100 mV s<sup>-1</sup>.

O estudo de cronocoulometria foi realizado com um sistema de três eletrodos (como descrito anteriormente) em uma célula eletroquímica contendo 10,0 mL do eletrólito de suporte (tampão McIlvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 3,5) e 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de MD. As medidas foram feitas aplicando um potencial de 0,5 V (vs. Ag/AgCl) no eletrodo de trabalho, por um intervalo de tempo de 500 s, medindo-se a carga acumulada na superfície do eletrodo por unidade de tempo.

O estudo de impedância eletroquímica foi realizado com um sistema de três eletrodos (como descrito anteriormente) em uma célula eletroquímica usando solução  $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  como sonda eletroquímica em circuito aberto com 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1 – 100000 Hz.

#### 4.3.4 Preparo da amostra e quantificação de MD

A amostra farmacêutica contendo MD foi obtida em uma farmácia da cidade de Florianópolis – SC, e analisada empregando os eletrodos CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP.

Para o preparo da amostra 4 comprimidos, contendo 250 mg cada, foram macerados em almofariz por cerca de 10 min. A massa pulverizada obtida foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL completando o volume com água. A solução foi deixada em agitação em béquer por 30 min, sendo então uma alíquota de 1 mL transferida para um balão de 5 mL. Esta solução diluída foi utilizada como solução estoque da amostra para os experimentos, no qual uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi transferida para a cela eletroquímica, e analisada por SWV, para obtenção dos dados.

Para verificar a exatidão da metodologia proposta, a amostra também foi quantificada através do método espectrofotométrico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) usado como comparativo. Primeiramente, foi preparada uma solução estoque da amostra no qual foram macerados 10 comprimidos em almofariz com pistilo, pesando-se 0,1 g que foram então diluídos em balão de 100 mL com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Preparou-se também uma solução estoque do padrão MD, no qual foram pesados 0,05 g de padrão MD diluído em balão de 50 mL com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Posteriormente, preparou-se duas soluções: solução da amostra e solução padrão adicionando-se 10 mL das respectivas soluções estoque mais 5 mL de solução tartarato ferroso, em balões de 100 mL, diluindo-se com tampão acetato de amônio pH 8,5. A solução padrão foi diluída em 5 concentrações diferentes ( $1,58 \times 10^{-4}$ ;  $2,37 \times 10^{-4}$ ;  $3,16 \times 10^{-4}$ ;  $3,94 \times 10^{-4}$  e  $4,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) para construção da curva de calibração externa por espectrofotometria Uv-vis, no qual cada concentração foi analisada em cubeta de 1 cm, comprimento de onda  $\lambda = 520 \text{ nm}$ , obtendo valores de absorvância. A solução da amostra também foi analisada em cubeta de 1 cm no mesmo comprimento de onda, sendo a concentração calculada a

partir do valor de absorvância da amostra e da equação de reta obtida da curva de calibração considerando-se as devidas diluições.



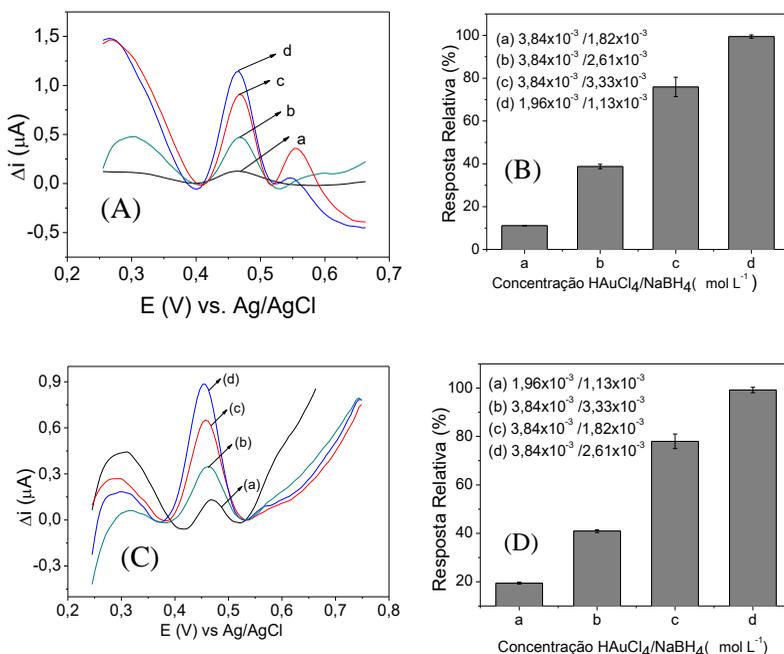
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da síntese das AuNP

Com o objetivo de analisar o desempenho dos polímeros DAS e PVP como agentes estabilizantes realizou-se duas sínteses: A primeira utilizando o polímero DAS em 10 mL de DMSO na proporção 0,25% (m/v) (SILVA *et al.*, 2015); e a segunda utilizando o polímero PVP nas mesmas condições. A otimização da síntese foi realizada para ambos os polímeros no qual variou-se: a concentração de  $1,96 \times 10^{-3}$  e  $3,84 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> da solução de HAuCl<sub>4</sub> e a concentração na faixa de  $1,13 \times 10^{-3}$  a  $3,33 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> da solução do agente redutor, NaBH<sub>4</sub>. A escolha das concentrações otimizadas da síntese foi feita monitorando a resposta de corrente de pico anódica dos eletrodos, preparados com as suspensões de nanopartículas sintetizadas a partir de diferentes concentrações de HAuCl<sub>4</sub> e NaBH<sub>4</sub>.

Na síntese de AuNP com o polímero DAS, o eletrodo modificado com a suspensão sintetizada a partir de solução de HAuCl<sub>4</sub>  $1,96 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e solução de NaBH<sub>4</sub>  $1,13 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> apresentou melhor resposta em corrente para a MD (Figuras 9 (A) e (B)). Avaliou-se também outras concentrações de NaBH<sub>4</sub> para esta concentração de HAuCl<sub>4</sub>, porém, observou-se que uma concentração menor de agente redutor ( $7,69 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) não houve a completa redução do ouro e concentrações maiores que  $4,1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> provocavam aglutinação e precipitação das nanopartículas, sendo então a proporção acima citada escolhida para os testes posteriores. Na síntese de AuNP com o polímero PVP, o eletrodo modificado com a suspensão sintetizada com solução de HAuCl<sub>4</sub>  $3,84 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e solução de NaBH<sub>4</sub>  $2,61 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> apresentou melhor resposta em corrente para a MD, como pode-se observar nas Figuras 9 (C) e (D), sendo esta escolhida para os demais estudos.

**Figura 9** (A) Voltamogramas obtidos para os eletrodos modificados com as suspensões sintetizadas a partir de diferentes concentrações de  $\text{HAuCl}_4$  e  $\text{NaBH}_4$ : AuNP/DAS (a)  $3,84 \times 10^{-3}/1,82 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , (b)  $3,84 \times 10^{-3}/2,61 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , (c)  $3,84 \times 10^{-3}/3,33 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  e (d)  $1,96 \times 10^{-3}/1,13 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  para MD ( $1,5 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ). (B) Respostas relativas (%). (C) Voltamogramas obtidos para os eletrodos modificados com as suspensões sintetizadas a partir de diferentes concentrações de  $\text{HAuCl}_4$  e  $\text{NaBH}_4$ : AuNP/PVP (a)  $1,96 \times 10^{-3}/1,13 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , (b)  $3,84 \times 10^{-3}/3,33 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , (c)  $3,84 \times 10^{-3}/1,82 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  e (d)  $3,84 \times 10^{-3}/2,61 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  para MD ( $1,5 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) em solução tampão McIlvaine 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 3,0) por SWV. (D) Respostas relativas (%).



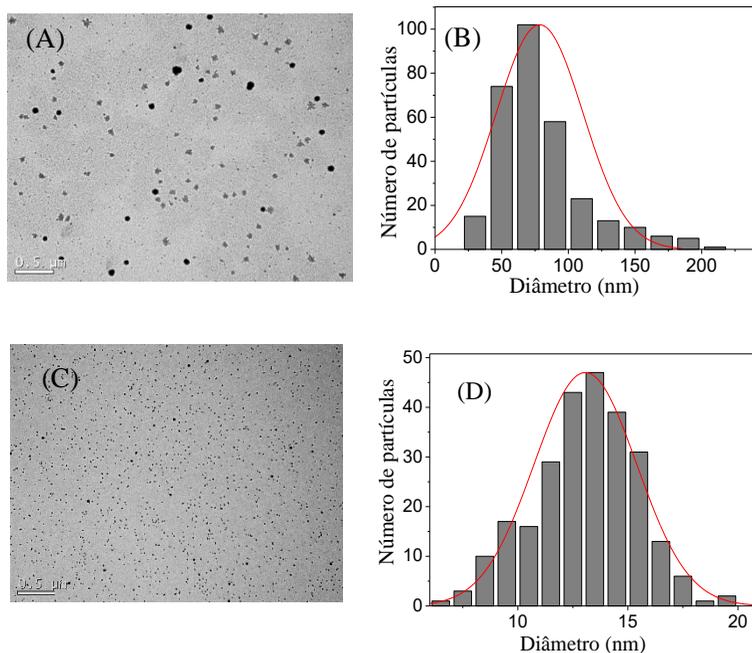
## 5.2 Caracterização das nanopartículas

Os materiais nanométricos apresentam novas propriedades não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico. Nessa escala de tamanho pode-se observar propriedades como, por exemplo, a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química, a condutividade elétrica e, no caso de NP, o

aumento de sua área superficial eletroativa tornando interessante seu emprego em eletrodos (FERREIRA, RANGEL, 2009). Com objetivo de avaliar o tamanho das nanopartículas (DAS/AuNP e PVP/AuNP) as suspensões foram caracterizadas por TEM e seus diâmetros médios calculados com auxílio do software ImajeJ (empregando um conjunto de aproximadamente 300 partículas escolhidas a partir das imagens de TEM). A Figura 10 (A) apresenta uma imagem de TEM das AuNP estabilizadas em DAS. Pode-se observar que as nanopartículas encontram-se bem dispersas no meio, exibindo poucos sinais de agregação, o que demonstra a eficiência do polímero em promover a estabilização. A Figura 10 (B) mostra o histograma da distribuição do número de partículas por diâmetro obtido nesta síntese. As DAS/AuNP apresentaram formato aproximadamente esférico com diâmetro médio de  $68,3 \pm 1,25$  nm. Na Figura 10 (C) temos uma imagem de TEM das AuNP estabilizadas em PVP. Pode-se observar que estas nanopartículas também se encontram bem dispersas no meio, exibindo poucos sinais de agregação. A Figura 10 (D) mostra o histograma da distribuição do número de partículas por diâmetro obtido nesta segunda síntese, na qual as PVP/AuNP apresentaram formato aproximadamente esférico com diâmetro médio de  $13,3 \pm 0,12$  nm.

Os diâmetros encontrados são condizentes com a coloração obtida para as duas sínteses, sendo as DAS/AuNP de maior diâmetro apresentando uma coloração roxa e as PVP/AuNP de menor tamanho apresentando coloração avermelhada (SEOUDI *et al.*, 2010).

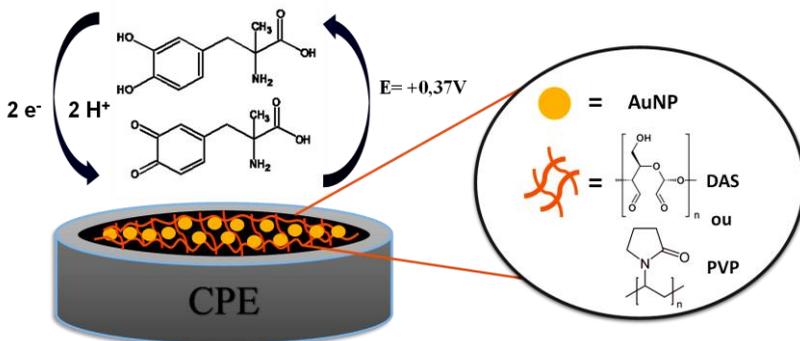
**Figura 10** Imagens de TEM para: (A) DAS/AuNP e (C) PVP/AuNP. Diagrama com a distribuição de números de partículas por diâmetros (B) DAS/AuNP e (D) PVP/AuNP.



### 5.3 Princípio de funcionamento dos CME

A Figura 11 mostra um esquema representativo dos componentes utilizados na construção dos eletrodos CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP e seu papel na reação de oxirredução da metildopa. Como pode ser observado, o processo ocorre pela reação de oxidação da MD à sua respectiva *o*-quinona na superfície do eletrodo. A reação de oxirredução da MD envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons a um potencial aproximado de +0,37 V vs. Ag/AgCl (KUTLUAY, ASLANOGLU, 2016, ENSAFI *et al.*, 2015). A corrente resultante do processo de oxidação é proporcional à concentração de MD, sendo usada para a quantificação desta substância em amostra farmacêutica.

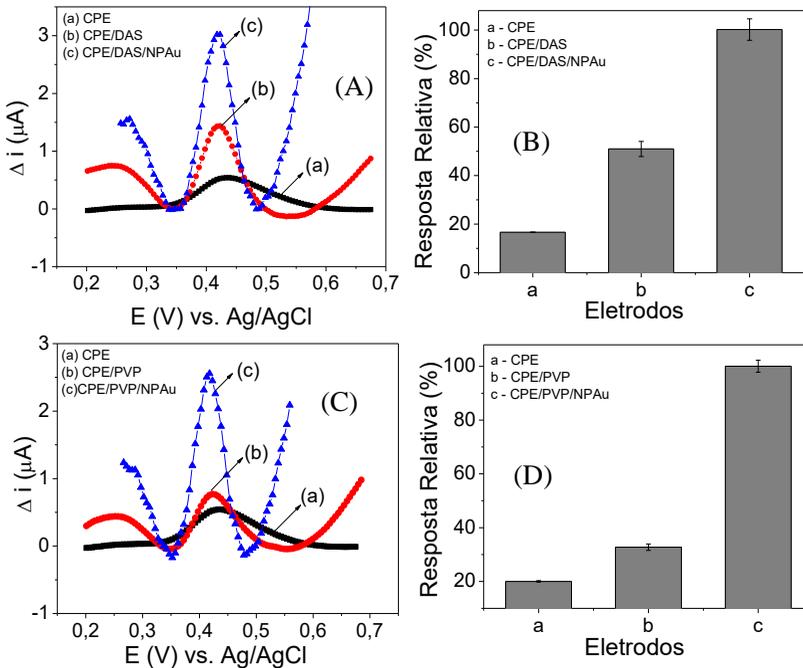
**Figura 11** Representação esquemática da reação de oxirredução da MD na superfície dos CME: CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP.



#### 5.4 Estudo da contribuição dos modificadores

A contribuição de cada modificador na resposta analítica da MD utilizando os CME foi avaliada construindo três eletrodos distintos: um CPE sem modificação, um CME modificado apenas com o polímero (CPE/DAS e CPE/PVP) e um CME modificado com a suspensão de nanopartículas estabilizada em ambos os polímeros (CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP). Os eletrodos foram testados, em triplicata, por SWV, na faixa de potencial de 0,2 a 0,7 V vs. Ag/AgCl empregando uma solução tampão McIlvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de MD. As Figuras 12 (A) e 12 (C) mostram os voltamogramas de onda quadrada obtidos e as respostas relativas (Figura 12 (B) e (D)) para cada modificador. A presença de DAS e PVP nos CME (eletrodo (b)) aumentou 1,5 a 2,5 vezes, respectivamente, o pico de corrente para a MD em relação ao CPE (eletrodo (a)), devido à ação de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo, possivelmente devido a interações de hidrogênio entre os grupos carbonila dos polímeros e os grupos hidroxila da molécula de MD. A presença das suspensões (DAS/AuNP e PVP/AuNP) no CME representou um ganho de resposta relativa para a MD de 83 e 79%, respectivamente, com relação ao CPE. Este expressivo ganho de corrente está relacionado ao fato de as AuNPs, presentes como modificador, contribuíram na transferência de elétrons devido seu caráter condutor, e, devido sua grande área superficial, também atuarem como sítios ativos para a MD, facilitando o processo redox.

**Figura 12** (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando solução tampão Mcllvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de MD, utilizando os eletrodos: (a) CPE; (b) CPE/DAS; e (c) CPE/DAS/AuNP. (B) Resposta relativa (%). (C) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando solução tampão Mcllvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de MD, utilizando os eletrodos: (a) CPE; (b) CPE/PVP; e (c) CPE/PVP/AuNP. (D) Resposta relativa (%).



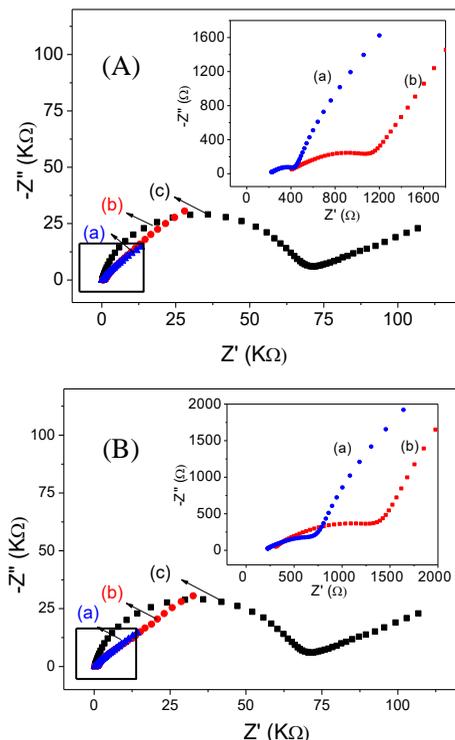
## 5.5 Caracterização eletroquímica dos CME

### 5.5.1 Impedância eletroquímica

A fim de investigar a reação de transferência de cargas na superfície do eletrodo um estudo foi realizado utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), utilizando uma solução KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 10 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> como sonda eletroquímica em circuito aberto com 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1 – 100000 Hz. Foram realizadas medidas de impedância com os seguintes eletrodos: CPE, CPE/DAS e CPE/DAS/AuNP (Figura 13 (A)), e CPE, CPE/PVP e CPE/PVP/AuNP (Figura 13 (B)). O valor de Rct obtido para o eletrodo sem modificação (CPE) foi de 66,80 kΩ que representa uma alta resistência à passagem de corrente quando comparado com os valores obtidos com os CME: 1,13 kΩ e 1,81 kΩ para CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, respectivamente. Isto demonstra uma grande vantagem da modificação dos eletrodos propostos, pois a diminuição da resistência no sistema facilita a transferência de elétrons na superfície dos eletrodos e, conseqüentemente, a reação de oxidação do analito de interesse.

Como é possível observar também nas Figuras 13 (A) e (B), o eletrodo CPE/DAS oferece uma resistência menor à passagem de corrente que a medida para o eletrodo CPE/PVP (cerca de 1,6 vezes menor). Este dado ajuda a explicar o alto valor de corrente obtido para o eletrodo CPE/DAS/AuNP, pois, o diâmetro de partícula maior obtido na síntese da AuNP em DAS é compensado pela diminuição da resistência a passagem de corrente oferecida por este polímero na superfície do eletrodo.

**Figura 13** (A) EIS para: (a) CPE/DAS/AuNP, (b) CPE/DAS e (c) CPE; (B) EIS para: (a) CPE/PVP/AuNP, (b) CPE/PVP e (c) CPE; em solução KCl ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) contendo  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4}$ , circuito aberto, 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1-100000 Hz.



### 5.5.2 Efeito da velocidade de varredura e estudo da área eletroativa dos eletrodos

Em medidas eletroanalíticas é de extrema importância conhecer o transporte de massa dominante no sistema em estudo para uma maior compreensão da cinética da reação de transferência de elétrons na superfície do eletrodo. Geralmente, buscam-se sistemas no qual a difusão seja o transporte regente, pois deste modo, assegura-se que a concentração do analito de interesse seja proporcional ao sinal de corrente obtido ao final da medida. Existem diversos testes que podem fornecer informações acerca da reversibilidade de sistemas e seu

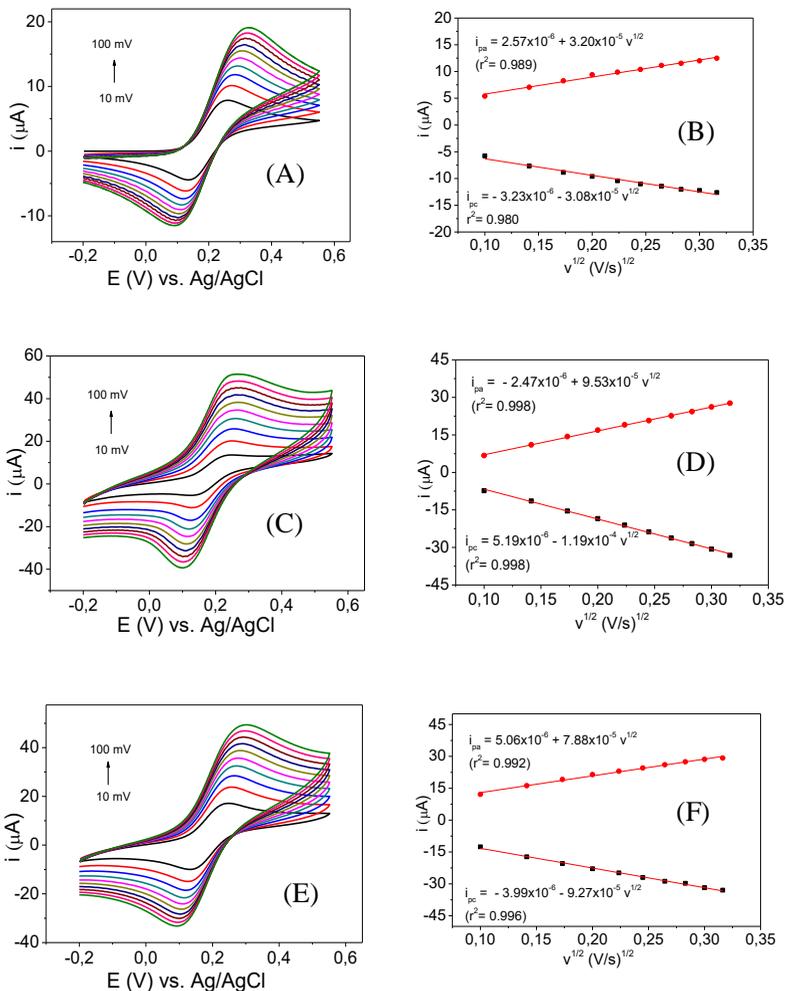
transporte de massa, dentre estes, o estudo da velocidade de varredura (BATCHELOR-MCAULEY *et al.*, 2015).

Avaliou-se a variação da velocidade de varredura em CV empregando solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 10,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> na seguinte faixa de velocidades: 10 - 100 mV s<sup>-1</sup>. O estudo foi realizado individualmente em três eletrodos diferentes, sendo um CPE sem modificação (resultados apresentados na Figura 14 (A)), e dois CME: CPE/DAS/AuNP (Figura 14 (C)) e CPE/PVP/AuNP (Figura 14 (E)). A partir dos dados obtidos construiu-se o gráfico  $i_p$  vs.  $v^{1/2}$  para avaliar a linearização conforme a equação de Randles-Sevcik (Eq. 1), no qual  $i_p$  refere-se a corrente de pico,  $n$  ao número de elétrons transferidos na reação eletroquímica ( $n=1$ ),  $A$  é a área superficial do eletrodo,  $D$  é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa,  $C$  é a concentração da espécie eletroativa (10,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) e  $v$  é a velocidade de varredura.

$$i_p = 2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} C v^{1/2} \quad (1)$$

Os gráficos representados nas Figuras 14 (B), (D), e (F) apresentam uma relação linear entre corrente e a raiz quadrada da velocidade, podendo-se concluir que em todos os eletrodos testados a reação eletroquímica, que ocorre no sistema, é controlada por difusão. Este gráfico, também fornece outro dado importante, a área eletroativa dos eletrodos. Através da Eq. 1 e substituindo os valores de concentração, números de elétrons, coeficiente angular das curvas e coeficiente de difusão da espécie, que é conhecido na literatura ( $D = 6,70 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) (LIANG *et al.*, 2013), determinou-se a área dos três eletrodos como sendo 0,0046 cm<sup>2</sup>, 0,0137 cm<sup>2</sup>, e 0,0113 cm<sup>2</sup>, para CPE, CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, respectivamente. Os dados demonstram a vantagem de se utilizar o modificador proposto como recurso para o ganho de sinal analítico, apresentando um aumento da área superficial de 2,5 a 3 vezes maior que a área superficial do eletrodo sem modificação.

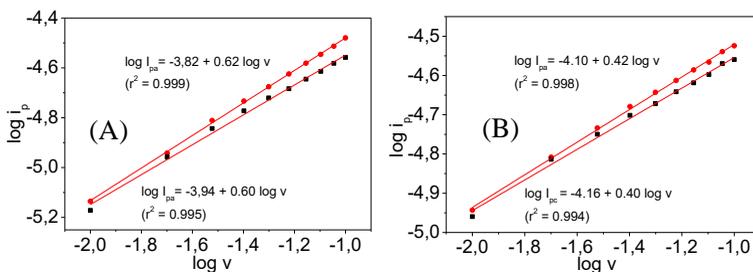
**Figura 14** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 10,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para (A) CPE, (C) CPE/DAS/AuNP e (E) CPE/PVP/AuNP; e seus respectivos gráficos ip x v<sup>1/2</sup> (B) CPE, (D) CPE/DAS/AuNP e (F) CPE/PVP/AuNP.



Outra evidência acerca do transporte de massa dominante no sistema pode ser obtida pelo gráfico de  $\log i_p$  vs.  $\log v$ . Segundo a literatura (SILVA *et al.*, 2015) valores de coeficiente angular próximos

de 1,0 indicam que o mecanismo de transporte de massa é controlado por adsorção, enquanto que valores próximos de 0,5 indicam que o processo eletródico é governado pela difusão. Os valores obtidos dos coeficientes angulares dos gráficos lineares, representados na Figura 15, para CPE/DAS/AuNP (A) e CPE/PVP/AuNP (B) foram, 0,60 e 0,40, respectivamente, indicando que o mecanismo de reação da oxidação da MD é provavelmente regido pelo processo de difusão com uma pequena contribuição da adsorção para o CPE/DAS/AuNP.

**Figura 15** Gráficos de  $\log i_p$  vs.  $\log v$  para (A) CPE/DAS/AuNP e (B) CPE/PVP/AuNP obtidos em solução KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 10,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.



### 5.5.3 Estudo da reversibilidade do sistema

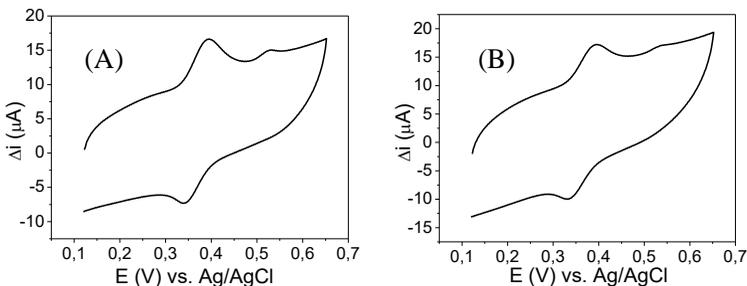
Para avaliar a reversibilidade da reação redox da MD foi feita a caracterização do sistema por voltametria cíclica. A partir dos voltamogramas mostrados nas Figuras 16 (A) e 16 (B) podemos constatar a reversibilidade da reação de oxidação da metildopa a um potencial de 0,37 V para ambos os eletrodos (CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP). A partir destes gráficos também é possível estimar o número de elétrons envolvidos na reação através da seguinte equação (BARD, FAULKNER, 2001) onde  $E_p$  é o potencial de pico padrão de redução e  $E_{p(1/2)}$  é o potencial de pico a meia onda.

$$\left| E_p - E_{p(1/2)} \right| = \frac{56,5}{n} mV \quad (2)$$

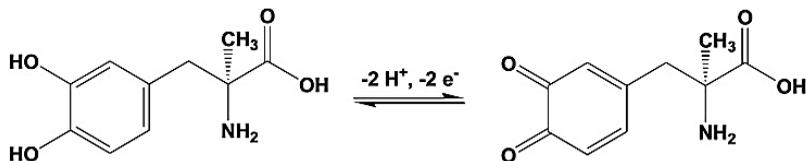
Os valores calculados para os eletrodos foram de 1,95 e 1,90 para CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP respectivamente, e são

condizentes com o esquema proposto na Figura 17 para uma reação envolvendo 2 elétrons.

**Figura 16** Voltamogramas cíclicos para (A) CPE/DAS/AuNP e (B) CPE/PVP//AuNP empregando MD  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão McIlvaine  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 17** Representação esquemática da reação de oxirredução da molécula de MD.



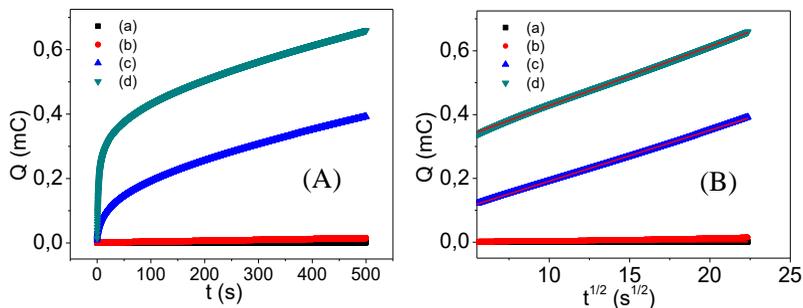
### 5.5.4 Cronocoulometria

A resposta em corrente obtida pelo eletrodo de trabalho pode estar relacionada, entre outras coisas, com a quantidade disponível de analito na sua superfície. Com o intuito de estudar a quantidade de cargas proveniente do analito (metildopa) que reage na superfície dos eletrodos (CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP//AuNP) realizou-se a cronocoulometria, que nos fornece dados como carga da dupla camada ( $Q_{dl}$ ) e carga de adsorção do analito ( $Q_{ads}$ ) que podem ser relacionados pela equação integrada de Cottrell (Eq. 3), onde  $A$  é a área do eletrodo,  $C$  é a concentração de MD,  $D$  é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa,  $F$  é a constante de Faraday,  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação e  $\pi$  é a constante pi.

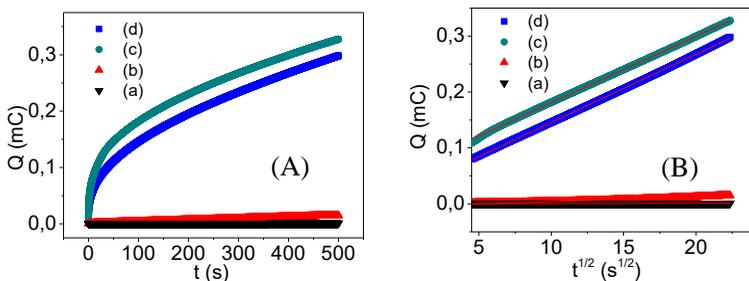
$$Q = 2nFACD^{1/2}t^{1/2}\pi^{1/2} + Q_{dl} + Q_{ads} \quad (3)$$

Tanto  $Q_{dl}$  como  $Q_{ads}$  são variáveis independentes do tempo sendo  $Q_{ads}$  determinado pelo gráfico de Anson, no qual o intercepto é a soma dos termos ( $Q_{dl} + Q_{ads}$ ) (CHEN *et al.*, 2016). Os estudos de cronocoulometria foram realizados a um potencial de 0,50 V, no qual foram registradas as curvas de carga ( $Q$ ) vs. tempo ( $t$ ) (Figuras 18 (A) e 19 (A)). Os dados obtidos foram então plotados como gráficos de Anson,  $Q$  vs.  $t^{1/2}$ , para análise dos dados. A Figura 18 (B) mostra as curvas  $Q$  vs.  $t^{1/2}$  para CPE (a) e CPE/DAS/AuNP (c) em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,5 e na presença de MD (CPE (b) e CPE/DAS/AuNP (d)). A mesma análise foi feita para o eletrodo CPE/PVP/AuNP, como pode ser visto na Figura 19 (B).

**Figura 18** (A) Cronocoulometria realizada a 0,5 V com  $1,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de metildopa em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,5, empregando (A): CPE (a) e CPE/DAS/AuNP (c) na ausência do analito e CPE (b) e CPE/DAS/AuNP (d) na presença do analito. (B) Gráficos de Anson feitos a partir dos dados obtidos das curvas  $Q$  vs.  $t$ .



**Figura 19** (A) Cronocoulometria realizada a 0,5 V com  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de metildopa em solução tampão Mcllvaine  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 3,5, empregando (A): CPE (a) e CPE/PVP/AuNP (c) na ausência do analito e CPE (b) e CPE/PVP/AuNP (d) na presença do analito. (B) Gráficos de Anson feitos a partir dos dados obtidos das curvas Q vs. t.



A Tabela 1 apresenta as equações das retas obtidas nos gráficos de Anson.

**Tabela 1** Equações da reta obtidas por meio dos experimentos de cronocoulometria.

Solução	Eletrodo	Equação da reta
Solução tampão Mcllvaine pH 3,5	CPE	$Q = 1,02 \times 10^{-9} + 4,67 \times 10^{-8} t^{1/2}$
Solução tampão Mcllvaine pH 3,5	CPE/DAS/ AuNP	$Q = 3,18 \times 10^{-5} + 1,59 \times 10^{-5} t^{1/2}$
Solução tampão Mcllvaine pH 3,5	CPE/PVP/ AuNP	$Q = 2,34 \times 10^{-5} + 1,22 \times 10^{-5} t^{1/2}$
Solução tampão Mcllvaine pH 3,5/ $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metildopa	CPE	$Q = 5,22 \times 10^{-9} + 8,06 \times 10^{-8} t^{1/2}$
Solução tampão Mcllvaine pH 3,5/ $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metildopa	CPE/DAS/ AuNP	$Q = 2,41 \times 10^{-4} + 1,86 \times 10^{-5} t^{1/2}$
Solução tampão Mcllvaine pH 3,5/ $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de metildopa	CPE/PVP/ AuNP	$Q = 6,19 \times 10^{-5} + 1,19 \times 10^{-5} t^{1/2}$

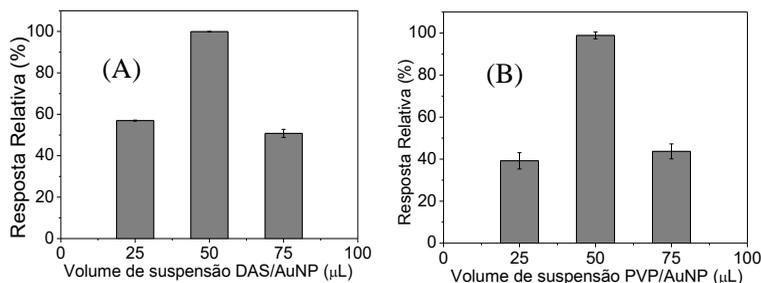
De acordo com a equação de Cottrell integrada, o valor de intercepto do gráfico  $Q$  vs.  $t^{1/2}$  em solução tampão McIlvaine pH 3,5 representa a carga de capacitância da dupla camada ( $Q_{dl}$ ), enquanto que o valor de intercepto na presença de MD é a soma de  $Q_{dl}$  e  $Q_{ads}$  (carga faradáica de espécies adsorvidas). Assim, os valores de  $Q_{ads}$  de MD em CPE, CPE/PVP/AuNP e CPE/DAS/AuNP foram calculados como sendo 0,004  $\mu\text{C}$ , 38,5  $\mu\text{C}$  e 209  $\mu\text{C}$ , respectivamente. Claramente, o eletrodo CPE/DAS/AuNP facilita atração do analito a superfície do eletrodo, comparativamente ao eletrodo CPE/PVP/AuNP, resultando em sinais de resposta mais elevados para a oxidação da MD.

## 5.6 Otimização do método

### 5.6.1 Efeito do volume das suspensões DAS/AuNP e PVP/AuNP adicionadas aos eletrodos

Como forma de avaliar o desempenho dos CME, o volume das suspensões (DAS/AuNP e PVP/AuNP), utilizadas como modificação na construção dos CME, foi variado na faixa de 25 a 75  $\mu\text{L}$  de suspensão adsorvida a pasta de carbono. A otimização foi feita avaliando o sinal de corrente obtido para os eletrodos contendo cada uma das quantidades. Observou-se que, em solução tampão McIlvaine 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 3,0 contendo  $1,5 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$  de MD, os CME que apresentaram maior ganho em corrente foram os eletrodos modificados com 50  $\mu\text{L}$  de suspensão DAS/AuNP (Figura 20 (A)) e 50  $\mu\text{L}$  de suspensão PVP/AuNP (Figura 20 (B)), sendo este volume selecionado para a construção dos CME. Para ambos os eletrodos modificados (CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP) foi possível constatar o aumento da resposta de corrente conforme aumento do volume de suspensão adicionada a pasta de carbono de 25  $\mu\text{L}$  para 50  $\mu\text{L}$ . Porém, quando foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  de suspensão ocorreu um decaimento da corrente medida. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de um aumento do volume de suspensão, a princípio, promover uma maior disponibilidade de nanopartículas na superfície dos eletrodos. As NP no meio facilitam a transferência de cargas atuando como sítios ativos para a reação de oxidação do analito até atingir um ponto de saturação onde ocorre um bloqueio parcial da superfície, dificultando a passagem de elétrons e diminuindo o valor de corrente medido.

**Figura 20** Influência do volume das suspensões (A) DAS/AuNP e (B) PVP/AuNP adicionadas a pasta de carbono na resposta analítica dos CME, em solução tampão McIlvaine ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 3,0) utilizando MD  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .



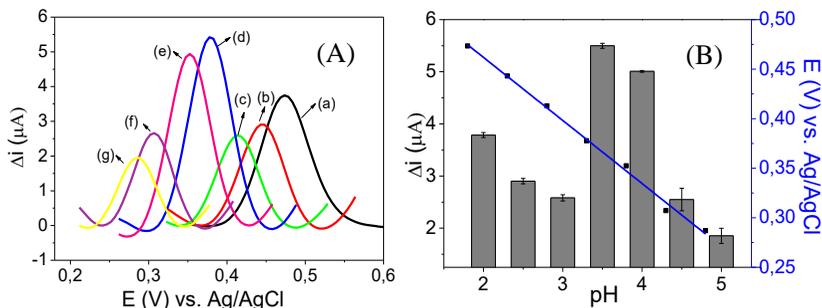
### 5.6.2 Estudo da natureza do eletrólito de suporte e pH

O eletrólito suporte é, por definição, um eletrólito que, adicionado em altas concentrações (cerca de 100x maior que a da espécie eletroativa), pode conferir à solução e à interface em estudo uma série de propriedades, como inibir o transporte de massa por migração, aumentar a condutividade do meio, manter a viscosidade da solução, manter o coeficiente de atividade da espécie eletroativa constante, entre outros (AGOSTINHO *et al.*, 2004). Por isso, é de extrema importância escolher cuidadosamente o tipo de eletrólito suporte a ser utilizado para uma determinada análise. Com o intuito de estudar o eletrólito mais adequado no estudo da MD, por voltametria, testaram-se eletrólitos como solução tampão McIlvaine ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,0); solução tampão Clark – Lubs ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,5), HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). A solução tampão Clark – Lubs apresentou um perfil de pico alargado bem como baixa resposta de corrente, e as soluções de HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , por apresentarem valores de pH muito ácidos, promoveram a lixiviação da superfície do eletrodo impossibilitando o seu uso como eletrólitos suporte. A solução tampão McIlvaine apresentou melhor resposta em corrente e melhor perfil voltamétrico para o analito de interesse, sendo este escolhido como eletrólito suporte para este trabalho. Foram testados também eletrólitos suporte de faixa básica (solução tampão fosfato,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e 8,0), porém não foi detectada a presença de pico referente a metildopa assumindo-se então que em meio básico o analito já se encontra em sua forma completamente oxidada.

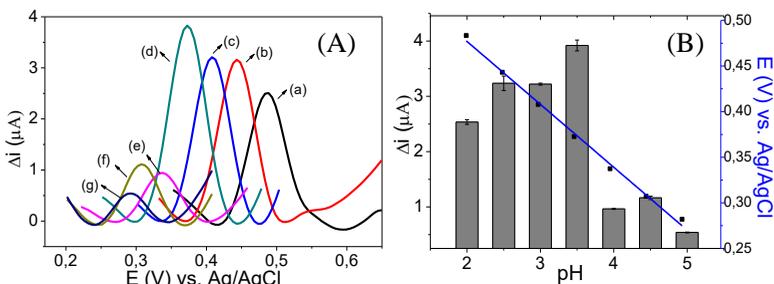
Além da escolha do eletrólito suporte mais adequado, a otimização do pH do meio reacional também é de extrema importância para assegurar o correto comportamento eletroquímico da espécie de interesse. A acidez ou basicidade do meio pode afetar diretamente a forma como a espécie eletroativa se encontra em solução (protonada ou desprotonada) alterando assim o modo como o analito irá reagir na superfície do eletrodo. Uma mudança estrutural indesejada pode gerar variações nos valores de corrente e potencial obtido na medida voltamétrica, refletindo negativamente na sensibilidade do método. Sendo assim, avaliou-se o efeito do pH do eletrólito suporte, em duplicata, para medidas empregando o CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, por SWV na faixa ácida de pH (2,0-5,0), utilizando MD  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Nos voltamogramas resultantes da otimização do pH para os eletrodos CPE/DAS/AuNP (Figura 21 (A)) e CPE/PVP/AuNP (Figura 22 (A)), pode-se notar em ambos o deslocamento do potencial para valores mais positivos conforme a diminuição do pH da solução. Este deslocamento favorece termodinamicamente a reação redox e está de acordo com o valor de pH ácido (3,5) que demonstrou o maior sinal de corrente para os eletrodos testados. Sendo assim, escolheu-se a solução tampão McIlvaine (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,5) como eletrólito suporte para os estudos posteriores.

De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 21(B) e 22(B) o potencial de pico para a MD apresentou uma relação linear com o pH, com valores de coeficiente angular de - 63,0 mV/pH ( $r^2 = 0,995$ ) e - 65,0 mV/pH ( $r^2 = 0,996$ ) para CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, respectivamente. Estes valores são muito próximos do valor previsto pela equação de Nernst (- 59,2 mV/pH;  $r^2 = 0,999$ ) (SILVA *et al.*, 2015) para reações que envolvem o mesmo número de prótons e elétrons, o que está de acordo com o estudo de caracterização do eletrodo discutido anteriormente e a equação proposta na Figura 17.

**Figura 21** (A): Voltamogramas de onda quadrada (frequência 50 Hz, amplitude de pulso 50 mV e incremento de potenciais de 5 mV) para CPE/DAS/AuNP, empregando MD  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão McIlvaine  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ : (a) pH 2,0; (b) pH 2,5; (c) pH 3,0; (d) pH 3,5; (e) pH 4,0; (f) 4,5 e (g) 5,0. (B) Gráfico de variação da corrente em função do pH e relação linear entre potencial e pH.



**Figura 22** (A): Voltamogramas de onda quadrada (frequência 50 Hz, amplitude de pulso 50 mV e incremento de potenciais de 5 mV) para CPE/PVP/AuNP, empregando MD  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão McIlvaine  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ : (a) pH 2,0; (b) pH 2,5; (c) pH 3,0; (d) pH 3,5; (e) pH 4,0; (f) 4,5 e (g) 5,0. (B) Gráfico de variação da corrente em função do pH e relação linear entre potencial e pH.

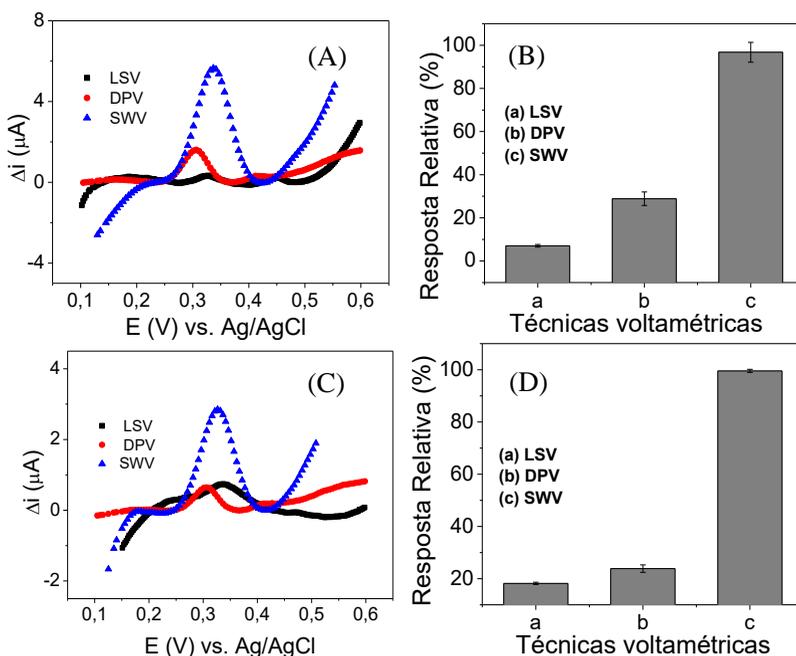


### 5.6.3 Escolha da técnica voltamétrica e otimização dos parâmetros

Após a escolha do eletrólito suporte e pH realizou-se estudos para a escolha da técnica voltamétrica mais adequada, ou seja, a que

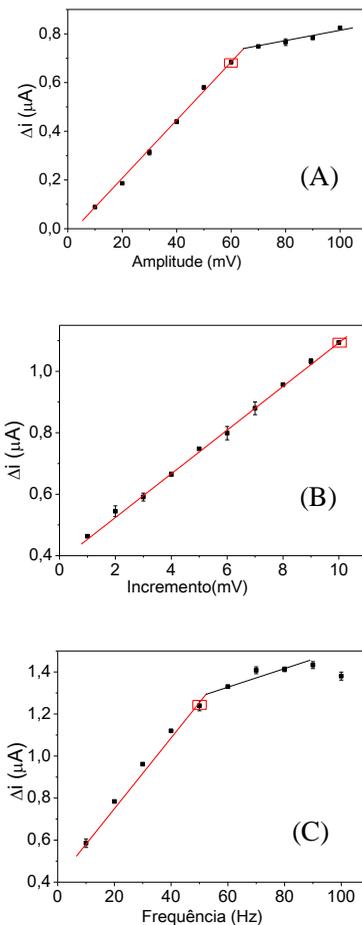
apresenta a melhor resposta analítica para o analito de interesse em termos de corrente e resolução de pico. Na Figura 23, estão representados os voltamogramas obtidos para cada técnica (DPV, SWV e LSV) (A e C) bem como os gráficos de resposta relativa (B e D) para os eletrodos CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, respectivamente. Observa-se que, para ambos os eletrodos, a técnica de SWV apresentou os melhores resultados gerando valores de corrente na ordem de 5 a 13 vezes maior que as outras técnicas empregadas apresentando também uma boa resolução de pico e, portanto, foi à técnica selecionada para ser empregada nos testes posteriores. A melhor resposta apresentada pela técnica de SWV pode ser explicada pelo tipo de aplicação de potencial usada nesta técnica. Como a medida é feita nos dois sentidos da varredura (redução e oxidação) a corrente total é a soma das correntes resultantes de cada medida, sendo favorecida no caso de sistemas reversíveis como a oxidação da MD.

**Figura 23** (A): Voltamogramas do estudo da técnica voltamétrica a ser empregada: (a) LSV; (b) DPV; (c) SWV para (A) CPE/DAS/NPAu; e (C) CPE/PVP/NPAu; com MD na concentração de  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão McIlvaine ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,5). Gráficos da resposta relativa em corrente para cada técnica, (B) CPE/DAS/NPAu; e (D) CPE/PVP/NPAu.

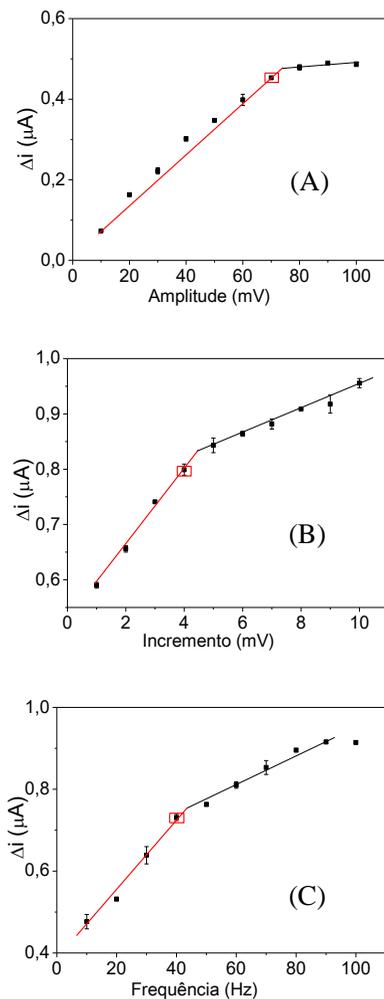


A técnica SWV possui três parâmetros experimentais: frequência, amplitude de pulso e incremento de potencial. A otimização destes parâmetros faz-se necessária de modo a obter uma melhor definição de pico e sensibilidade na determinação analítica, contribuindo para uma melhora na metodologia proposta. Nesta técnica, a amplitude de pulso está diretamente relacionada à resolução do pico, o incremento relacionado ao espaçamento entre os pontos de potenciais no voltamograma, que também contribuem para a resolução e adequada correlação entre corrente e concentração, e a frequência, assim como o incremento de potencial, está associada à velocidade de varredura e, portanto, seu valor deve estar condizente com a cinética da reação a ser estudada. Os efeitos dos parâmetros da SWV – frequência (10-100 Hz), amplitude (10-100 mV) e incremento (1-10 mV) – foram investigados, em duplicata empregando MD na concentração de  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão McIlvaine ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 3,5) para o CPE/DAS/AuNP e o CPE/PVP/AuNP. Pode-se observar (Figura 24) que para o eletrodo CPE/DAS/AuNP a amplitude (curva A) cresce linearmente até o valor de 60 mV, o incremento (curva B) possui linearidade até o valor máximo testado (10 mV), porém valores maiores não foram avaliados devido à perda de resolução do pico, e a frequência (curva C) possui maior resposta em corrente para o valor de 50 Hz, pois a partir deste ponto ocorre a perda da linearidade. Sendo assim, uma melhor resposta analítica foi obtida para os valores 60 mV de amplitude, 10 mV de incremento e 50 Hz de frequência. Para o eletrodo CPE/PVP/AuNP, a partir da Figura 25 podemos avaliar que o valor de amplitude (curva A) máximo foi obtido em 70 mV, o incremento (curva B) cresce linearmente até o valor de 4 mV ocorrendo a partir deste ponto uma mudança da linearidade da reta, comportamento que se repete no parâmetro da frequência (curva C) onde há o aumento da intensidade de corrente até 40 Hz, limite máximo da linearidade. Para este eletrodo (CPE/PVP/AuNP) fixou-se então os valores de 70 mV de amplitude, 4 mV de incremento e 40 Hz de frequência.

**Figura 24** Estudo dos parâmetros da SWV (A) amplitude de pulso; (B) incremento de potencial e (C) frequência sobre a resposta analítica do eletrodo CPE/DAS/AuNP, utilizando MD  $1,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em solução tampão McIlvaine (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 3,5).



**Figura 25** Estudo dos parâmetros da SWV (A) amplitude de pulso; (B) incremento de potencial e (C) frequência sobre a resposta analítica do eletrodo CPE/PVP/AuNP, utilizando MD  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em solução tampão McIlvaine ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 3,5).



A Tabela 2 resume os parâmetros investigados e também os melhores resultados obtidos na otimização do método para os eletrodos CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP.

**Tabela 2** Parâmetros de otimização do método.

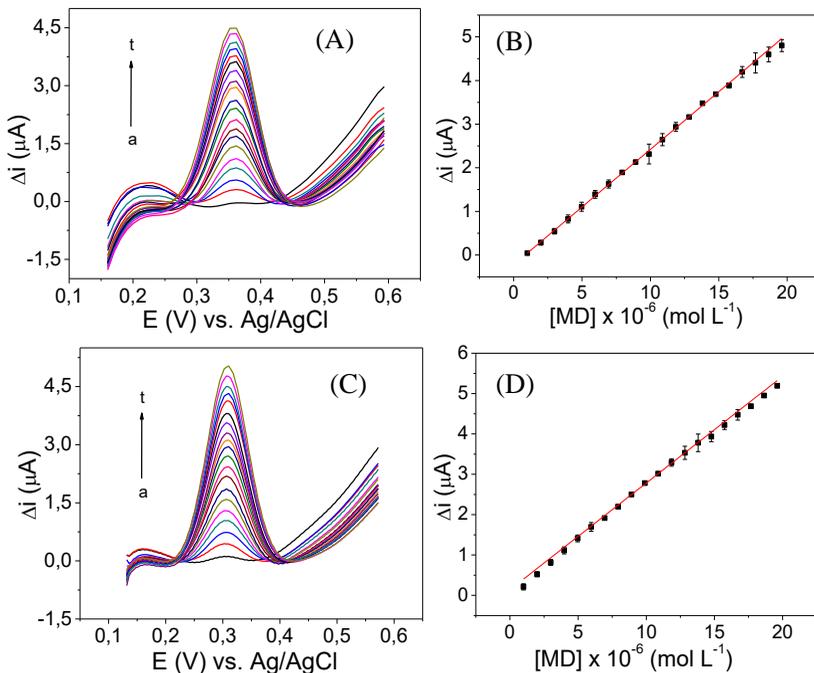
Parâmetro	Faixa investigada		
		CPE/DAS/AuNP	CPE/PVP/AuNP
<b>AuNP/eletrodo (v/m)</b>	25 – 75 (µL)	50	50
<b>Natureza do eletrólito suporte</b>	Soluções tampão: Mcllvaine, tampão Clark-Lubs, HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	Mcllvaine	Mcllvaine
<b>Faixa de pH</b>	2,0 – 5,0	3,5	3,5
<b>Escolha da técnica</b>	LSV, DPV, SWV	SWV	SWV
<b>Amplitude de pulso</b>	10 – 100 (mV)	60	70
<b>Incremento de potencial</b>	1 – 10 (mV)	10	4
<b>Frequência</b>	10 – 100 (Hz)	50	40

## 5.7 Desempenho analíticos dos CME

### 5.7.1 Curva de calibração externa

As Figuras 26 (A) e (C) apresentam os voltamogramas de onda quadrada na faixa de potencial de +0,2 a + 0,6 V *vs.* Ag/AgCl e as curvas de calibração (B) e (D) para MD utilizando o CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, respectivamente, nas melhores condições experimentais estabelecidas.

**Figura 26** Voltamogramas de SWV obtidos utilizando (A) CPE/DAS/AuNP e (C) CPE/PVP/AuNP em solução tampão McIlvaine (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 3,5) para MD, nas seguintes concentrações: (a)  $9,99 \times 10^{-7}$ ; (b)  $1,99 \times 10^{-6}$ ; (c)  $2,99 \times 10^{-6}$ ; (d)  $3,98 \times 10^{-6}$ ; (e)  $4,97 \times 10^{-6}$ ; (f)  $5,96 \times 10^{-6}$ ; (g)  $6,95 \times 10^{-6}$ ; (h)  $7,93 \times 10^{-6}$ ; (i)  $8,92 \times 10^{-6}$ ; (j)  $9,90 \times 10^{-6}$ ; (k)  $1,09 \times 10^{-5}$ ; (l)  $1,18 \times 10^{-5}$ ; (m)  $1,28 \times 10^{-5}$ ; (n)  $1,38 \times 10^{-5}$ ; (o)  $1,47 \times 10^{-5}$ ; (p)  $1,57 \times 10^{-5}$ ; (q)  $1,67 \times 10^{-5}$ ; (r)  $1,76 \times 10^{-5}$ ; (s)  $1,86 \times 10^{-5}$  e (t)  $1,96 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Curvas de calibração para (B) CPE/DAS/AuNP e (D) CPE/PVP/AuNP.



Os parâmetros de linearidade das curvas de calibração para os dois eletrodos (CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP) são mostrados na Tabela 3. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a correlação entre os pontos ( $r^2$ ), obtida com ambos os eletrodos (0,996), satisfaz o valor imposto por lei ( $r^2 > 0,99$ ). O limite de detecção (LOD), menor concentração do analito que pode ser detectada com razoável certeza para uma dada metodologia analítica (RIBEIRO *et al.*, 2008), foi calculado através dos parâmetros da curva de calibração (Equação 2).

$$LOD = 3 \frac{\sigma}{s} \quad (4)$$

no qual “3” representa o fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança exigido (neste caso 95 %), “ $\sigma$ ” representa o desvio do intercepto e “s” o valor da inclinação da curva de calibração (RIBEIRO *et al.*, 2008). Os limites de quantificação (LOQ) foram calculados usando os parâmetros da curva de calibração, apenas substituindo o valor de 3 por 10 na equação do cálculo do LOD (Equação 3).

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{s} \quad (5)$$

**Tabela 3** Parâmetros das curvas de calibração, limites de detecção e quantificação.

<b>CME</b>	<b>Faixa linear (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Equação</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>LOD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (mol L<sup>-1</sup>)</b>
CPE/DAS/AuNP	9,99x10 <sup>-7</sup> a 1,96x10 <sup>-5</sup>	$\Delta i = 0,25[\text{MD}] \pm 3,56 \times 10^{-3} -$ $8,07 \times 10^{-8} \pm 4,20 \times 10^{-8}$	0,996	5,04x10 <sup>-7</sup>	1,68x10 <sup>-6</sup>
CPE/PVP/AuNP	9,99x10 <sup>-7</sup> a 1,96x10 <sup>-5</sup>	$\Delta i = 0,26[\text{MD}] \pm 3,44 \times 10^3$ $+ 5,61 \times 10^{-8} \pm 4,06 \times 10^{-8}$	0,996	4,69x10 <sup>-7</sup>	1,56x10 <sup>-6</sup>

A Tabela 4 resume os resultados descritos na literatura, obtidos com diferentes CME empregando vários materiais, para determinação de MD. Como pode ser observado, o CME proposto apresenta um LOD próximo a outros trabalhos que também utilizam o CPE como eletrodo base, sendo consideravelmente mais sensível em um dos casos, indicando que a metodologia proposta é adequada para a determinação de metildopa.

**Tabela 4** Comparação de diferentes CME aplicados na determinação de MD.

Eletrodo	Modificador <sup>a</sup>	Técnica	Faixa linear ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	Ref.
CPE	Cu(OH) <sub>2</sub> nanoparticles	SWV	2,0 - 450	0,5	(GHOREIS HI <i>et al.</i> , 2015)
CPE	ILs/ MWCNTPE	SWV	0,4 - 400	0,1	(FOULAD GAR, KARI MI-MALEH, 2013)
CPE	Lac CA/BMI-N(Tf) <sub>2</sub>	SWV	34.8 - 337	5,5	(MOCCELI NI <i>et al.</i> , 2011)
CPE	<i>p</i> -CAMCNTPE	SWV	0,5 – 165	0,2	(KARIMI-MALEH <i>et al.</i> , 2012)
CPE	DAS/AuNP	SWV	0,9 – 19,6	0,5	Este trabalho

ILs: líquido iônico; MWCNTPE: eletrodo de pasta de nanotubos de carbono em múltiplas camadas; Lac: enzima lacase; CA: acetato de celulose; BMI-N(Tf)<sub>2</sub>: líquido iônico bis(trifluorometanosulfonil)imidato de 1-n-butil-3-metilimidazólio; *p*-CAMCNTPE: eletrodo de pasta de nanotubos de carbono com *p*-cloranil.

### 5.7.2 Estudo da repetibilidade entre medidas e entre eletrodos

Os ensaios para avaliar a repetibilidade entre medidas do CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, foram realizados por SWV, em duplicata, utilizando MD  $1,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão McIlvaine (0,1

mol L<sup>-1</sup>; pH 3,5). A repetibilidade foi investigada através de seis medidas sucessivas, utilizando cada um dos CME, sendo a superfície renovada após cada medida. O desvio padrão relativo (RSD) entre as correntes de pico resultantes nessas medidas foram de 7,8% e 2,1% para CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP, respectivamente. Os valores abaixo de 10% indicam que os CME, apresentam boa precisão entre as medidas. A repetibilidade entre eletrodos foi investigada por SWV, em duplicata, utilizando MD 1,5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> em tampão McIlvaine (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 3,5). Foram construídos três eletrodos CPE/DAS/AuNP e três eletrodos CPE/PVP/AuNP, sendo cada um destes testados em duplicata. Para este estudo o RSD das correntes de pico resultantes para CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP foram de 5,9% e 3,2%, respectivamente, valores abaixo de 10%, indicando que os eletrodos possuem uma excelente repetibilidade.

## **5.8 Aplicação do CPE/DAS/AuNP**

Os testes de otimização e caracterização dos eletrodos, dentre eles espectroscopia de impedância eletroquímica, estudo da área superficial eletroativa e cronocoulometria, demonstraram que o CPE/DAS/AuNP possui uma excelente resposta de corrente e perfil voltamétrico, bem como oferece vantagens na detecção do analito de interesse (diminuição da resistência a transferência de elétrons e acúmulo do analito na superfície do eletrodo) com relação ao CPE/PVP/AuNP. Sendo assim, o CPE/DAS/AuNP foi escolhido como eletrodo de trabalho para determinação de MD em amostra farmacêutica.

### **5.8.1 Estudos de recuperação**

Os ensaios de recuperação, que avaliam a exatidão de um dado método analítico (RIBANI et al., 2004), foram realizados através do método de adição de padrão, em duplicata, utilizando-se o CPE/DAS/AuNP e uma amostra (A) de comprimidos de MD. Medidas de recuperação foram obtidas por adição de três diferentes concentrações de padrão MD (1,99; 3,98 e 5,96 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) sobre 100 µL de amostra em tampão McIlvaine (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,5). A percentagem de recuperação variou na faixa de 95,3 a 105,2%, indicando que a matriz da amostra não oferece interferência, e a metodologia empregada possui boa exatidão (Tabela 5).

**Tabela 5** Estudos de recuperação para a MD em amostra farmacêutica utilizando o CPE/DAS/AuNP.

Amostra <sup>a</sup>	MD ( $10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> )		
	Adicionado	Recuperado <sup>b</sup>	Recuperação (%) <sup>c</sup>
A	1,99	2,03 ± 0,13	101,8
	3,98	4,19 ± 0,32	105,2
	5,96	5,68 ± 0,36	95,3

<sup>a</sup>A = comprimido de MD obtido comercialmente;

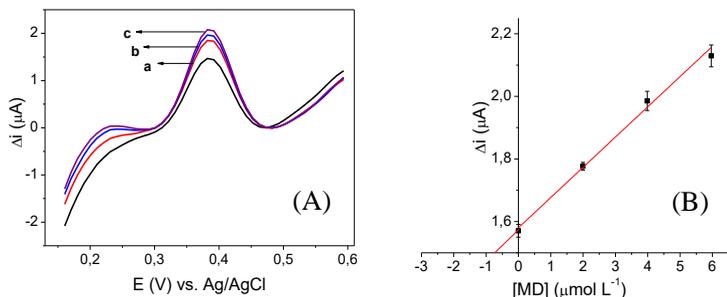
<sup>b</sup>Média ± desvio padrão; n=3;

<sup>c</sup>Recuperação = (valor encontrado/valor adicionado) x 100.

### 5.8.2 Determinação de MD em fármaco

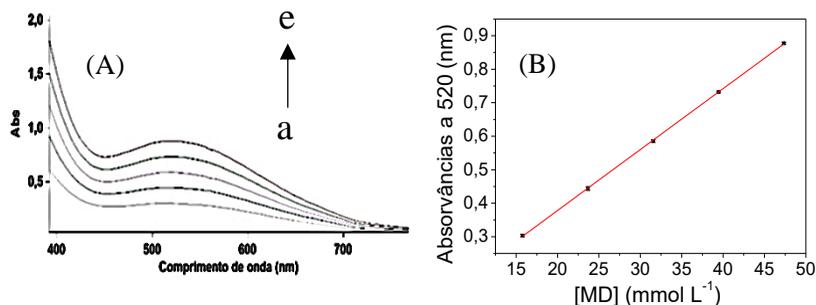
Com o intuito de testar a eficiência e aplicabilidade do CPE/DAS/AuNP na determinação de MD, empregou-se o método eletroanalítico desenvolvido através da construção de uma curva de calibração por adição de padrão. Sobre uma alíquota de 100  $\mu$ L de amostra, adicionaram-se três alíquotas de solução padrão de MD em diferentes concentrações ( $1,99 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>;  $3,98 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e  $5,96 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>). A equação de reta obtida foi de  $i_p = 1,58 \times 10^{-6} (\pm 1,30 \times 10^{-8}) + 0,096 (\pm 0,005) [\text{MD}]$ , com coeficiente de correlação de  $r^2 = 0,991$ . A sensibilidade da curva difere muito da sensibilidade obtida com a curva de calibração externa, o que indica que a matriz da amostra causa interferência na determinação de MD. Sendo assim, a concentração do analito foi calculada com base nos dados obtidos da curva de calibração por adição de padrão. A Figura 27 mostra os voltamogramas obtidos com a adição de padrão (A) e sua curva linear correspondente (B) obtida em triplicata.

**Figura 27** (A) Voltamogramas de SWV obtidos utilizando CPE/DAS/AuNP, em tampão Mcllvaine ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,5), e soluções de padrão MD nas seguintes concentrações: (a)  $1,99 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; (b)  $3,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e (c)  $5,96 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (frequência de 50 Hz, amplitude de pulso de 60 mV e incremento de 10 mV) adicionadas sobre uma alíquota de  $100 \mu\text{L}$  de amostra. (B) Curva de calibração por adição de padrão.



Para avaliar a exatidão do método eletroanalítico realizou-se também a quantificação de MD na amostra farmacêutica usando o método espectrofotométrico recomendado pela Farmacopeia Brasileira. Inicialmente, construiu-se a curva de calibração externa a partir da medida de seis alíquotas de solução padrão em diferentes concentrações de MD ( $1,58 \times 10^{-4}$ ;  $2,37 \times 10^{-4}$ ;  $3,16 \times 10^{-4}$ ;  $3,94 \times 10^{-4}$ ;  $4,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) que foram analisadas por espectrofotômetro na região Uv-Vis em comprimento de onda de 520 nm, como mostra a Figura 28 (A). O cálculo da concentração de MD na amostra foi feito substituindo-se o valor de absorvância obtido para a alíquota da amostra na equação de reta da curva de calibração (Figura 23 (B)), calculando-se as devidas diluições.

**Figura 28** (A) Espectro de absorvância obtido da curva de MD, nas seguintes concentrações: (a)  $1,58 \times 10^{-4}$ ; (b)  $2,37 \times 10^{-4}$ ; (c)  $3,16 \times 10^{-4}$ ; (d)  $3,94 \times 10^{-4}$  e (e)  $4,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  por espectrofotometria Uv-Vis em comprimento de onda 520 nm. (B) Curva de calibração externa de MD.



A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para o teor de MD (expresso em miligrama/comprimido) em amostra farmacêutica, usando o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira, método eletroanalítico proposto e o valor rotulado.

**Tabela 6** Determinação de MD em amostra farmacêutica usando o CME proposto e o método comparativo.

Amostra <sup>a</sup>	MD (mg/comprimido)			Erro Relativo (%) <sup>c</sup>	
	Rótulo	Método Espectrofotométrico <sup>b</sup>	CPE/DAS/AuNP <sup>b</sup>	ER <sub>1</sub>	ER <sub>2</sub>
A	250,00	265,73 ± 0,58	255,90 ± 0,41 <i>t<sub>c</sub></i> = 0,34 <i>F<sub>c</sub></i> = 0,50	3,70	2,36

<sup>a</sup>Comprimidos de MD adquiridos comercialmente.

<sup>b</sup>Média ± desvio padrão, n=3

*t<sub>c</sub>* = valor de *t* calculado e *t<sub>r</sub>* valor teórico (2,77), nível de confiança de 95%

*F<sub>c</sub>* = valor de *F* calculado e *F<sub>t</sub>* = valor teórico (19,00), nível de confiança de 95%.

<sup>c</sup>ER<sub>1</sub> = CPE/DAS/AuNP vs. Método espectrofotométrico; ER<sub>2</sub> = CPE/DAS/AuNP vs. Rótulo.

A Farmacopeia Brasileira estipula que uma amostra farmacêutica de MD (comprimido) deve conter um teor de, no mínimo 90,0% e, no máximo, 110,0%, da quantidade declarada na embalagem.

Os valores encontrados a partir das determinações com o CME proposto e o método espectrofotométrico correspondem a 102,4% e 106,3% do valor rotulado, respectivamente, o que demonstra que a amostra comercial analisada possui um valor de concentração em concordância com o limite estabelecido pela legislação.

Os resultados obtidos com o CPE/DAS/AuNP foram comparados aos obtidos com o método comparativo aplicando-se os testes t e F (SKOOG *et al.*, 2008). O valor de F calculado ( $F_c$ ) foi menor que o F teórico ( $F_T$ ) (19,00) (Tabela 4), o que indica que o CME proposto possui exatidão quando comparado com o método espectrofotométrico, com um nível de confiança de 95%. O valor de t calculado ( $t_c$ ) também foi inferior ao valor teórico ( $t_T$ ) (2,77) (Tabela 4), e indica que os valores de concentração de MD, na mesma amostra farmacêutica, quantificados por ambos os métodos (CPE/DAS/AuNP e método espectrofotométrico) não possuem diferença significativa em um nível de confiança de 95%. O CPE/DAS/AuNP também apresentou baixo erro relativo, quanto ao valor quantificado, comparado ao valor de concentração rotulado no medicamento (2,36). Desta forma, pode-se concluir que o CME proposto bem como o método eletroanalítico empregado são adequados para a determinação de MD em amostras farmacêuticas.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou a construção de um CPE modificado com AuNP estabilizadas em DAS, comparando a um CPE modificado com AuNP estabilizadas em PVP, para aplicação na determinação eletroanalítica de metildopa em amostra farmacêutica, visando obter uma metodologia simples, sensível e de baixo custo.

As sínteses das nanopartículas, em ambos os polímeros, foram propriamente otimizadas e caracterizadas assim como a proporção da suspensão destas na construção dos eletrodos CPE/DAS/AuNP e CPE/PVP/AuNP. A caracterização de ambos os eletrodos foi feita a partir de estudos de velocidade para a determinação da área superficial ativa do eletrodo e estudos de impedância eletroquímica. Estes testes serviram para mostrar o bom funcionamento do polímero proposto (DAS) na construção do CME, demonstrando que este confere ao eletrodo uma maior área superficial ativa e menor resistência a passagem de corrente com relação ao polímero comparativo (PVP).

Após a completa otimização das condições experimentais, como eletrólito suporte, pH do meio reacional e parâmetros da técnica voltamétrica escolhida, a reação de oxidação da MD nos eletrodos foi investigada e se mostrou reversível a um potencial de + 0,37 V sendo o processo controlado por difusão. A curva de calibração obtida para a MD, com os CME, foi linear na faixa de concentração de 0,99 a  $19,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $r^2 = 0,996$ ). Os limites de detecção foram de  $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $1,68 \mu\text{mol L}^{-1}$ , e quantificação  $0,46 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,56 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para o CME proposto e comparativo, respectivamente. Os CME também apresentaram excelentes valores de repetibilidade entre medidas e entre eletrodos. Escolheu-se o CME proposto para aplicação na quantificação de MD em comprimido farmacêutica, o qual apresentou boa correlação com os resultados obtidos utilizando o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira (espectrofotométrico) concluindo-se que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos.

O método proposto também oferece vantagens como a facilidade na construção, baixo custo e rápido tempo de análise que, aliado a boa sensibilidade e detectabilidade apresentada, faz deste método uma excelente alternativa para determinação de metildopa presente em fármaco. Como perspectiva do presente trabalho, há a possibilidade de teste do CME proposto em amostras biológicas (matrizes complexas) bem como o estudo da sua aplicação na determinação de analitos similares.



## 7 REFERÊNCIAS

ABSALAN, G., AKHOND, M., ERSHADIFAR, H. & REZAEI, M. A. Two-approach study for preparing stable colloidal gold nanoparticles in organic solvents by using 1-dodecyl-3-methylimidazolium bromide as an efficient capping and phase transfer agent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 486, p. 192-202, 2015.

AFZALI, D., ZAREI, S., FATHIRAD, F. & MOSTAFAVI, A. Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol. **Materials Science and Engineering: C**, v. 43, p. 97-101, 2014.

AGOSTINHO, S. M. L., VILLAMIL, R. F. V., AGOSTINHO NETO, A. & ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, p. 813-817, 2004.

AMENDOLA, V., MENEGHETTI, M., STENER, M., GUO, Y., CHEN, S., CRESPO, P., GARCÍA, M. A., HERNANDO, A., PENGU, P. & PASQUATO, L. Chapter 3 - Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles. *In*: MIGUEL, V. & ÁNGELA, I. L.-L. (eds.) **Comprehensive Analytical Chemistry**. Elsevier, v. 66, p. 81-152, 2014

ARÉVALO, F. J., OSUNA-SÁNCHEZ, Y., SANDOVAL-CORTÉS, J., DI TOCCO, A., GRANERO, A. M., ROBLEDO, S. N., ZON, M. A., VETTORAZZI, N. R., MARTÍNEZ, J. L., SEGURA, E. P., ILINÁ, A. & FERNÁNDEZ, H. Development of an electrochemical sensor for the determination of glycerol based on glassy carbon electrodes modified with a copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 244, p. 949-957, 2017.

BATCHELOR-MCAULEY, C., KÄTELHÖN, E., BARNES, E. O., COMPTON, R. G., LABORDA, E. & MOLINA, A. Recent Advances in Voltammetry. **ChemistryOpen**, v. 4, p. 224-260, 2015.

CECCHIN, I., REDDY, K. R., THOMÉ, A., TESSARO, E. F. & SCHNAID, F. Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic

contaminants in soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**.

CHEN, X., JI, L., ZHOU, Y. & WU, K. Synergetic enhancement of gold nanoparticles and 2-mercaptobenzothiazole as highly-sensitive sensing strategy for tetrabromobisphenol A. **Scientific Reports**, v. 6, p. 26044, 2016.

CHENG, H.-W., SKEETE, Z. R., CREW, E. R., SHAN, S., LUO, J. & ZHONG, C.-J. 2014. Chapter 2 - Synthesis of Gold Nanoparticles. In: MIGUEL, V. e ÁNGELA, I. L.-L. (Ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**: Elsevier, v. 66, p.37-79, 2014.

DÍAZ-CRUZ, C., ALONSO NUÑEZ, G., ESPINOZA-GÓMEZ, H. & FLORES-LÓPEZ, L. Z. 2016. Effect of molecular weight of PEG or PVA as reducing-stabilizing agent in the green synthesis of silver-nanoparticles. **European Polymer Journal**, v. 83, p. 265-277, 2016.

DONEGÁ, C. D. M. 2014. *Nanoparticles : workhorses of nanoscience* [Online]. Available: <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1965967>.

DURST, R. A. 1997. Chemically modified electrodes: Recommended terminology and definitions (IUPAC Recommendations 1997). **Pure and Applied Chemistry**. 69: 1317 p. 1997.

ENSAFI, A. A., AHMADI, N. & REZAEI, B. 2017. Nickel nanoparticles supported on porous silicon flour, application as a non-enzymatic electrochemical glucose sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239, 807-815.

ENSAFI, A. A., SAEID, B., REZAEI, B. & ALLAFCHIAN, A. R. 2015. Nickel nanoparticles supported on porous silicon flour, application as a non-enzymatic electrochemical glucose sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 807-815, 2017.

FERREIRA, H. S. & RANGEL, M. D. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, p. 1860-1870, 2009.

FOULADGAR, M. & KARIMI-MALEH, H. Ionic liquid/multiwall carbon nanotubes paste electrode for square wave voltammetric determination of methyl dopa. **Ionics**, v. 19, n. 8, p. 1163-1170, 2013.

GADKARIEM, E. A., IBRAHIM, K. E. E., KAMIL, N. A. A., HAGA, M. E. M. & EL-OBEID, H. A. A new spectrophotometric method for the determination of methyl dopa. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 4, p. 289-293, 2009.

GHOLIVAND, M. B. & AMIRI, M. Highly sensitive and selective determination methyl dopa in the presence of ascorbic acid using OPPy/TY/Au modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 694, p. 56-60, 2013.

GHOREISHI, S. M., SAEIDINEJAD, F., BEHPOUR, M. & MASOUM, S. Application of multivariate optimization to electrochemical determination of methyl dopa drug in the presence of diclofenac at a nanostructured electrochemical sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 576-585, 2015.

GILJOHANN, D. A., SEFEROS, D. S., DANIEL, W. L., MASSICH, M. D., PATEL, P. C. & MIRKIN, C. A. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 19, p. 3280-3294, 2010.

JAIN, P. K., LEE, K. S., EL-SAYED, I. H. & EL-SAYED, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 14, p. 7238-7248, 2006.

KARG, M., SCHELERO, N., OPPEL, C., GRADZIELSKI, M., HELLWEG, T. & VON KLITZING, R. Versatile Phase Transfer of Gold Nanoparticles from Aqueous Media to Different Organic Media. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 16, p. 4648-4654, 2011.

KARIMI-MALEH, H., KHALILZADEH, M. A., RANJBARHA, Z., BEITOLLAHI, H., ENSAFI, A. A. & ZAREYEE, D. p-Chloranil modified carbon nanotubes paste electrode as a voltammetric sensor for

the simultaneous determination of methyl dopa and uric acid. **Analytical Methods**, v. 4, n. 7, p. 2088-2094, 2012.

KAVOSI, B., SALIMI, A., HALLAJ, R. & MORADI, F. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 915-923, 2015.

KIM, B. K. & KODA, R. T. Fluorometric Determination of Methyl dopa in Biological Fluids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 11, p. 1632-1634, 1977.

KUTLUAY, A. & ASLANOGLU, M. Quantification of methyl dopa in pharmaceuticals using a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 1, p. 91-95, 2016.

LANE, R. F. & HUBBARD, A. T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 1401-1410, 1973.

LEE, J. Intrinsic Adhesion Properties of Poly(vinyl pyrrolidone) to Pharmaceutical Materials: Humidity Effect. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 11, p. 1085-1093, 2005.

LI, S.-F., WU, H.-L., YU, Y.-J., LI, Y.-N., NIE, J.-F., FU, H.-Y. & YU, R.-Q. 2010. Quantitative analysis of levodopa, carbidopa and methyl dopa in human plasma samples using HPLC-DAD combined with second-order calibration based on alternating trilinear decomposition algorithm. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 805-812, 2010.

LÓPEZ-LORENTE, Á. I. & VALCÁRCEL, M. Chapter 1 - Analytical Nanoscience and Nanotechnology. In: MIGUEL, V. e ÁNGELA, I. L.-L. (Ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**: Elsevier, v. 66, p.3-35, 2014.

LU, X., TUAN, H.-Y., KORGEL, B. A. & XIA, Y. Facile Synthesis of Gold Nanoparticles with Narrow Size Distribution by Using AuCl or AuBr as the Precursor. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 14, n. 5, p. 1584-1591, 2008.

MELO JR., M. A., SANTOS, L. S. S., GONÇALVES, M. D. C. & NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, p. 1872-1878, 2012.

MOCCELINI, S. K., FRANZOI, A. C., VIEIRA, I. C., DUPONT, J. & SCHEEREN, C. W. A novel support for laccase immobilization: Cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 8, p. 3549-3554, 2011.

MODY, V. V., SIWALE, R., SINGH, A. & MODY, H. R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282-289, 2010.

MOLAAKBARI, E., MOSTAFAVI, A. & BEITOLLAHI, H. First report for voltammetric determination of methyl dopa in the presence of folic acid and glycine. **Materials Science and Engineering: C**, v. 36, p. 168-172, 2014.

MOSES, P. R., WIER, L. & MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975/10/01 1975.

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

PRIECEL, P., ADEKUNLE SALAMI, H., PADILLA, R. H., ZHONG, Z. & LOPEZ-SANCHEZ, J. A. Anisotropic gold nanoparticles: Preparation and applications in catalysis. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 10, p. 1619-1650, 2016.

Principles and Mechanisms of Nanoparticle Stabilization by Polymers. **Metallopolymer Nanocomposites**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005.

RADI, A.-E. Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Pharmaceutical Analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, n. 8, p. 728-752, 2010.

RAMÍREZ, C., DEL VALLE, M. A., ISAACS, M. & ARMIJO, F. Electrochemical oxidation of catecholamines on fluorine-doped SnO<sub>2</sub> substrates. Square-wave voltammetric method for methyl dopa determination in pharmaceutical dosage forms. **Electrochimica Acta**, v. 199, p. 227-233, 2016.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROSY & GOYAL, R. N. Gold nanoparticles decorated poly-melamine modified glassy carbon sensor for the voltammetric estimation of domperidone in pharmaceuticals and biological fluids. **Talanta**, v. 141, p. 53-59, 2015.

SALDÍAS, C., LEIVA, Á., BONARDD, S., QUEZADA, C., SALDÍAS, S., PINO, M. & RADIC', D. A facile one-step synthesis of noble metal nanoparticles in DMSO using poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) block copolymers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 96, p. 78-88, 2015.

SAXENA, N. & SINGH, M. Efficient synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles under air for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 429, p. 166-176, 2017.

SEOUDI, R., FOU DA, A. A. & ELMENSHAWY, D. A. Synthesis, characterization and vibrational spectroscopic studies of different particle size of gold nanoparticle capped with polyvinylpyrrolidone. **Physica B: Condensed Matter**, v. 405, n. 3, p. 906-911, 2010.

SILVA, T. G.; SALLES, M. O.; PAIXÃO, T. R. L. C. Investigação do uso de eletrodo de carbono vítreo modificado com hexacianoferrato de rutênio para detecção de procaína. **Química Nova**, v. 38, p. 85-90, 2015

SILVA, T. R., BRONDANI, D., ZAPP, E. & CRUZ VIEIRA, I. Electrochemical Sensor Based on Gold Nanoparticles Stabilized in Poly(Allylamine hydrochloride) for Determination of Vanillin. **Electroanalysis**, v. 27, n. 2, p. 465-472, 2015.

SPENCE, K. E., JANE, J.-L. & POMETTO, A. L. Dialdehyde starch and zein plastic: Mechanical properties and biodegradability. **Journal of environmental polymer degradation**, v. 3, n. 2, p. 69-74, 1995.

ŠVANCARA, I., VYTRÁS, K., BAREK, J. & ZIMA, J. 2 Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 311-345, 2001.

TALEBPOUR, Z., HAGHGOO, S. & SHAMSIPUR, M. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methyl dopa in human serum and pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**, v. 506, n. 1, p. 97-104, 2004.

TRIVINHO-STRIXINO, F., SANTOS, J. S. & DE SOUZA SIKORA, M. 3 - SÍNTESE ELETROQUÍMICA DE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS. In: (Ed.). **Nanoestruturas**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., p.63-120, 2015.

TURKEVICH, J., STEVENSON, P. C. & HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 0, p. 55-75, 1951.

WANG, X., GU, Z., QIN, H., LI, L., YANG, X. & YU, X. Crosslinking effect of dialdehyde starch (DAS) on decellularized porcine aortas for tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 813-821, 2015.

ZHAO, W.-R., KANG, T.-F., LU, L.-P., SHEN, F.-X. & CHENG, S.-Y. A novel electrochemical sensor based on gold nanoparticles and molecularly imprinted polymer with binary functional monomers for

sensitive detection of bisphenol A. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 786, p. 102-111, 2017.