



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Estudo para o Desenvolvimento de Metodologia  
Eletroanalítica na Determinação de 17 $\alpha$ -  
metiltestosterona”**

**Raul Xavier de Mendonça**

Toledo – PR, 2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Estudo para o Desenvolvimento de Metodologia  
Eletroanalítica na Determinação de 17 $\alpha$ -  
metiltestosterona”**

**Raul Xavier de Mendonça**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* de Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

**Orientador(a): Cleber Antonio Lindino  
Coorientador(a): Josiane Caetano Dragunski**

Toledo – PR, 2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Mendonça, Raul Xavier

Estudo para o desenvolvimento de metodologia eletroanalítica na determinação de 17 $\beta$ -metiltestosterona / Raul Xavier Mendonça; orientador(a), Cleber Antonio Lindino; coorientador(a), Joseane Caetano Dragunski, 2018. 51 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

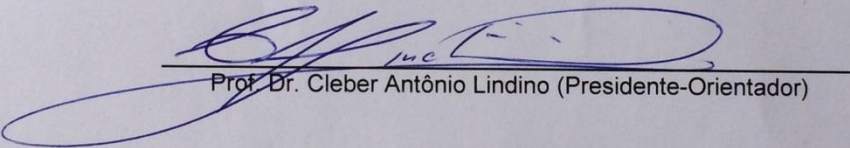
1. masculinização. 2. hormônio . 3. eletrodo de grafite . 4. técnicas voltamétricas. I. Lindino, Cleber Antonio. II. Dragunski, Joseane Caetano. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

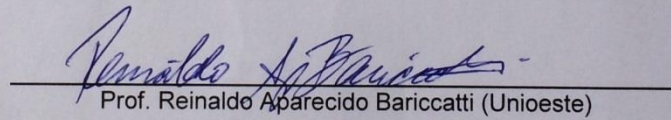
**Raul Xavier de Mendonça**

**“Estudo para o Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica na Determinação de 17 $\alpha$ -metiltestosterona”.**

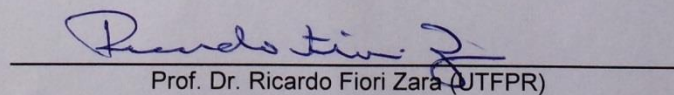
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:



Prof. Dr. Cleber Antônio Lindino (Presidente-Orientador)



Prof. Reinaldo Aparecido Bariccatti (Unioeste)



Prof. Dr. Ricardo Fiori Zera (UTFPR)

Aprovada em: 02 de agosto de 2018.

Local de defesa: Miniauditório do Gerpel – Unioeste/Campus de Toledo.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	– OBJETIVO.....	15
3	– REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
3.1	17 $\alpha$ -metiltestosterona.....	15
3.2	Voltametria de onda quadrada .....	16
3.3	Métodos voltamétricos.....	18
3.4	Estudo da utilização de eletrodo de filme de bismuto.....	20
3.5	Estudo da utilização do nitroprussiato de sódio .....	21
3.6	Estudo da utilização do permanganato de potássio .....	23
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	24
4.1	- Materiais e Métodos .....	24
4.1.1	– Estudo com eletrodo de bismuto.....	24
4.1.2	– Teste com nitroprussiato de sódio .....	25
4.1.3	– Teste com permanganato de potássio.....	25
4.2	- Equipamentos .....	25
4.3	- Metodologias.....	25
4.3.1	– Preparo e estudo do eletrodo de bismuto .....	25
4.3.2	Preparo do eletrodo de grafite .....	25
4.3.3	– Estudo do nitroprussiato de sódio.....	26
4.3.4	–Estudo do permanganato de potássio .....	26
5	RESULTADO E DISCUSSÃO .....	26
5.1	Estudos utilizando-se eletrodo de bismuto .....	26
5.2	Estudos utilizando-se nitroprussiato de sódio .....	29
5.3	Estudos utilizando-se permanganato de potássio .....	39

6	CONCLUSÃO.....	49
7	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.1:</b> Estrutura química da 17 $\alpha$ -metiltestosterona (adaptado de <a href="https://www.chemeo.com/">https://www.chemeo.com/</a> , acessada em Novembro 2017).....	15
<b>Figura 3.2.1:</b> Método de ação do potencial na voltametria de onda quadrada (Pacheco e col.).....	18
<b>Figura 3.5.1:</b> Estrutura química do Nitroprussiato de Sódio (adaptado de <a href="http://www.chemspider.com/">http://www.chemspider.com/</a> , acessada em novembro de 2017) .....	22
<b>Figura 5.2.1:</b> Voltamograma da voltametria cíclica da solução branco com diferentes velocidades de varredura de 20, 50, 70, 100 mV/s e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura .....	30
<b>Figura 5.2.2:</b> Voltamograma de voltametria cíclica da solução nitroprussiato com diferentes velocidades de varredura de 20, 50, 70, 100 mV/s e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura .....	30
<b>Figura 5.2.3:</b> Voltamograma de voltametria de onda quadrada da solução nitroprussiato com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, incremento de potencial de 2 mV e diferentes pulso de potencial e frequência: A – pulso de potencial de 25 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz, B - pulso de potencial de 50 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz, C - pulso de potencial de 70 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz. D - pulso de potencial de 100 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz. A seta indica o sentido de varredura .....	31
<b>Figura 5.2.4:</b> Voltamograma de voltametria cíclica da solução nitroprussiato com diferentes velocidades de varredura de 20, 50, 100, 200 mV/s e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura .....	32
<b>Figura 5.2.5:</b> Voltamograma de voltametria de onda quadrada da Solução Branco com adições de 20 e 40 $\mu$ L da Solução Padrão de 17 $\alpha$ -metiltestosterona com frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de potencial de 2 mV e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura .....	33
<b>Figura 5.2.6:</b> Voltamograma de voltametria cíclica com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V da Solução de nitroprussiato de sódio em meio alcalino na presença de KCl variando a velocidade de varredura de 20, 50, 100 e 200 mV s <sup>-1</sup> . A seta indica o sentido de varredura .....	34
<b>Figura 5.2.7:</b> Voltamograma de voltametria de onda quadrada da solução de nitroprussiato de sódio em meio alcalino na presença de KCl com potencial de varredura	

de 0,1 a 1,0 V, pulso de potencial de 100 mV, incremento de potencial de 2 mV e nas frequências de aquisição de 25, 50, 100 e 200 Hz. A seta indica o sentido de varredura.	34
<b>Figura 5.2.8:</b> Voltamograma da voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 1,1 V, frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV, da curva de adição de padrão com volumes de adição de 20, 60, 80 e 80 $\mu$ L da Solução Padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura.....	36
<b>Figura 5.2.9:</b> Voltamograma da voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV, da curva de adição de padrão com o volume de adição de 20 $\mu$ L da solução padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura.....	36
<b>Figura 5.2.10:</b> Complexo formado de MT-Nitroprussiato (água implícita) .....	37
<b>Figura 5.2.11:</b> Espectro de absorbância UV-Vis da solução do complexo formado entre nitroprussiato e metiltestosterona com e sem a adição de KCl 0,5 mol L <sup>-1</sup> . .....	38
<b>Figura 5.2.12:</b> Espectro de absorbância UV-Vis da 17 $\alpha$ -metiltestosterona (adaptado de <a href="https://spectrabase.com">https://spectrabase.com</a> acessado em 20/10/2018) .....	38
<b>Figura 5.3.1:</b> Voltamograma da voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV da curva de adição de padrão da solução padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura .....	39
<b>Figura 5.3.2:</b> Curva de adição de padrão da solução padrão de MT vs corrente ( $y = 0,0136x + 1,7711$ e $R^2 = 0,9817$ ).....	40
<b>Figura 5.3.3:</b> Intermediários de degradação de MT proveniente do estudo de processos oxidativos avançados, detectado por CG-EM (adaptado de Hu e col. (2012)).....	42
<b>Figura 5.3.4:</b> Fotografia no tempo 0 (T – 0) e após 45 minutos (T – 45) das adições das alíquotas das soluções de análise contendo MT. ....	43
<b>Figura 5.3.5:</b> Voltamograma de voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 0,9 V, frequência de aquisição de 50 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV da curva de adição de padrão da Solução Padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura .....	44
<b>Figura 5.3.6:</b> Curva da adição de padrão da solução padrão de MT, utilizando-se os valores de concentração e corrente de potencial apresentados na Tabela 5.3.2. ( $y = -0,0133x + 161,46$ e $R^2 = 0,7932$ ).....	45



<b>Figura 5.3.7:</b> Superfície do eletrodo auxiliar, eletrodo de platina, após as leituras da curva da adição de padrão da Solução Padrão de MT (A), com depósito de matéria, e antes das leituras (B) .....	45
<b>Figura 5.3.8:</b> Espectro de absorção da solução branco analisada no tempo zero e após 45 minutos e da solução contaminada com solução padrão de MT analisadas a cada 4 minutos. ....	46
<b>Figura 5.3.9:</b> Curva da adição de padrão da solução padrão de MT, utilizando-se os valores de concentração e corrente de potencial apresentados na TAB. 5.3.3. Resultados da leitura realizada por voltametria de onda quadrada. A – todos as soluções( $y = -0,0051x + 89,626$ , $R^2 = 0,6705$ ), B – retirada a solução 6 ( $y = -0,0184x + 103,51$ , $R^2 = 0,924$ ).....	48
<b>Figura 5.3.10:</b> Curva da adição de padrão da solução padrão de MT, utilizando-se os valores de concentração e absorbância apresentados na TAB. 5.3.3. Resultados da leitura realizada por espectrofotometria Uv-Vis. A – todos as soluções ( $y = -6x10^{-5}x + 0,9788$ , $R^2 = 0,9874$ ), B – retirado a solução 6 ( $y = -4x10^{-5}x + 0,9585$ , $R^2 = 0,8317$ ) .....	49

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 5.1.1:</b> Testes realizados no meio de solução de HCl 1 mol L <sup>-1</sup> com alteração do potencial e tempo de deposição .....	27
<b>Tabela 5.1.2:</b> Testes realizados no meio de solução de CH <sub>3</sub> COONa 0,05 mol L <sup>-1</sup> com alteração do potencial e tempo de deposição .....	27
<b>Tabela 5.1.3:</b> Testes realizados para a pré-concentração da MT na superfície do eletrodo com alteração do potencial e tempo.....	29
<b>Tabela 5.3.1:</b> Volume adicionado, concentração de MT e resposta em corrente da curva da solução padrão de MT .....	39
<b>Tabela 5.3.2:</b> Informações de volume adicionado, concentração de MT e corrente da curva de adição de padrão da solução padrão de MT.....	43
<b>Tabela 5.3.3:</b> Teste Grubbs para identificação de outlier.....	46
<b>Tabela 5.3.4:</b> Volume adicionado, concentração de MT e corrente obtida para a curva da solução padrão de MT .....	47

# ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ELETROANALÍTICA NA DETERMINAÇÃO DE 17 $\alpha$ -METILTESTOSTERONA

Raul Xavier de Mendonça

## Resumo

A 17 $\alpha$ -metiltestosterona é utilizada para a masculinização de camarões, tilápias do Nilo e outros peixes, de geneticamente fêmeas para machos fenotipicamente. É um hormônio que atua no sistema endócrino e se acumula progressivamente nos níveis tróficos. Órgãos públicos que dispõem sobre a classificação dos corpos de água não possuem legislação vigente para este fim, fazendo-se necessário o controle deste hormônio no meio ambiente. Devido à escassez de métodos eletroanalíticos, a determinação deste hormônio foi estudada com a utilização do nitroprussiato de sódio, permanganato de potássio além dos eletrodos de bismuto e pasta de grafite por meio de técnicas voltamétricas. Utilizando-se eletrodo de grafite, foi obtida a determinação do analito por meio da complexação com o nitroprussiato, observando-se pico de potencial em 430 mV. Com uso do permanganato de potássio observou-se o consumo do íon permanganato em 176 mV, confirmado com o auxílio da espectrofotometria UV-Vis.

**Palavras chave:** masculinização, hormônio, técnicas voltamétricas, nitroprussiato de sódio, permanganato de potássio, eletrodo de grafite.

# STUDY FOR THE DEVELOPMENT OF ELECTROANALITIC METHODOLOGY IN THE DETERMINATION OF 17 $\alpha$ -METHYLTESTOSTERONE

Raul Xavier de Mendonça

## Abstract

The 17 $\alpha$ -methyltestosterone used to masculinize shrimp, Nile tilapia and other fish, from genetically female to male phenotypically, it is a hormone that acts on the endocrine system and accumulates progressively at trophic levels. Public agencies do not have legislation in force for its control, making it necessary to control this hormone in the environment. Due to the scarcity of electroanalytical methods, the determination of this hormone was studied with the use of sodium nitroprusside, potassium permanganate with bismuth electrodes and graphite paste of voltammetric techniques. Using a Nujol and graphite electrode, the analyte was determined by complexation with nitroprusside, observing a potential peak at 430 mV. With the use of potassium permanganate it was noticed the consumption of the permanganate ion in 176 mV, confirmed with the aid of UV-Vis spectrophotometry.

**Key-words:** masculinize, hormone, voltammetric techniques, sodium nitroprusside, potassium permanganate, graphite electrode.

# 1 INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico mundial provocou grandes mudanças na produção dos alimentos, necessitando de maior demanda para suprir a população mundial. Com isso, surgem também novos métodos produtivos, como o aumento do uso de produtos químicos e sistemas de produção em massa, gerando inúmeros poluentes e causando sérios problemas ambientais.

O problema a ser enfrentado está diretamente relacionado com o controle de qualidade dos alimentos e ao processo de monitoramento dos recursos naturais. Com o aumento da utilização de produtos químicos, pesquisas desenvolvidas com objetivo de fornecer respostas relacionadas aos impactos ambientais e monitoramento das atividades humanas, também veem crescendo nas últimas décadas. As atividades humanas estão diretamente relacionadas com degradação e poluição ambiental e a atividade química.

Poluentes ambientais que atuam no sistema endócrino dos seres vivos e se acumulam progressivamente nos níveis tróficos ao longo da teia alimentar são substâncias que causam sérios prejuízos ao meio ambiente, podendo gerar verdadeiros desastres ambientais.

Pouco monitorados ou regulamentados em relação aos efeitos ao meio ambiente ou tempo de meia vida, inúmeros compostos orgânicos e inorgânicos são produzidos e utilizados em diferentes matrizes e ecossistemas. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) com a Resolução CONAMA 357/2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências e o Ministério da Saúde com a portaria nº 2.914/2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, não preconizam limites para poluentes emergentes, como os hormônios que estejam como contaminantes passivos de controle [1,2].

Um das formas mais básicas de subsistência da população mundial, a aquicultura teve seu início na Ásia há mais de 4.000 anos. Em busca de um hábito alimentar mais saudável, o consumo de peixe vem aumentando. Com isso, a prática de piscicultura aumenta 10% ao ano, consolidando o setor da agropecuária que mais cresceu no final do século XX [3,4]. Entre 2005 e 2015 a aquicultura brasileira teve um crescimento de 257 mil para 574 mil toneladas de pescado, o que corresponde um

aumento de 123%. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil é a 14º maior produtor aquícola do mundo [5]. Também segundo a FAO, a produção da pesca e aquicultura no Brasil registrará um crescimento de 104% em 2025.

Hormônios andrógenos a base de 17 $\alpha$ -metiltestosterona (MT) são utilizados para aumentar a produção na aquicultura, sendo aplicados ainda na fase larval obtendo aproximadamente 90% de sucesso da reversão sexual das fêmeas em machos ou mais adequadamente a masculinização da espécie. Problemas de superpopulação e desnutrição encontrados em uma cultura ambiental de machos e fêmeas são contornados nas criações em cativeiro, por meio de uma população de um único sexo, maximizando sua taxa de crescimento.

O efeito deste hormônio no meio ambiente é pouco conhecido. Estudos realizados em laboratórios mostram que peixes não tratados com a 17 $\alpha$ -metiltestosterona quando expostos à água de recirculação, oriundas de tanques de criação com presença deste hormônio, apresentaram masculinização [6]. Assim, aumenta-se a preocupação dos lançamentos de efluentes oriundos da aquicultura.

Devido à falta de legislação do controle de limite máximo na água e de dados disponíveis na literatura, o lançamento destes efluentes que contem a 17 $\alpha$ -metiltestosterona não é monitorado nos corpos hídricos e também no tratamento de água para o abastecimento público.

Diante disso, o monitoramento de corpos d'água quanto à presença deste hormônio sintético, faz-se necessário devido aos impactos quando exposto a efluente de piscicultura. É de conhecimento que substâncias hormonalmente ativas, mesmo em baixas concentrações, causam sérios impactos na estrutura do ecossistema aquático e impactos nos seres humanos que consomem esta água. A proteção dos recursos hídricos constitui em uma necessidade vital para a posteridade.

## 2 – OBJETIVO

Estudar metodologias eletroanalíticas para a determinação da 17 $\alpha$ -metiltestosterona.

## 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 17 $\alpha$ -metiltestosterona

A 17 $\alpha$ -metiltestosterona, como mostrada na FIG. 3.1.1, de fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>, possui massa molar de 302,458 g mol<sup>-1</sup>, pó branco cristalino, praticamente insolúvel em água e facilmente solúvel em etanol [7]. É um hormônio sexual derivado sintético da testosterona, pertencente ao grupo dos hormônios esteroides anabolizantes androgênicos responsáveis pelas características sexuais dos mamíferos masculinos. Na medicina é utilizada no tratamento dos sintomas da andropausa, como paliativo no tratamento do câncer de mama nas mulheres, dores pós-parto e obstruções nos seios [8-10].



**Figura 4.1.1:** Estrutura química da 17 $\alpha$ -metiltestosterona (adaptado de <https://www.chemeo.com/>, acessada em Novembro 2017)

Problemas de superpopulação e desnutrição encontrados em uma cultura ambiental de machos e fêmeas são contornados nas criações em cativeiro, por meio de uma população de um único sexo, maximizando sua taxa de crescimento visto que o macho possui uma taxa de crescimento maior que das fêmeas [14]. Assim, a utilização deste hormônio ocorre nos primeiros dias de cultivo incorporado na ração dos animais

[14]. Estes hormônios podem se acumular progressivamente de um nível trófico para o outro ao longo da teia alimentar, caso a metabolização for baixa ou ausente nos níveis mais baixos. Estes resíduos de hormônios ativos podem estar presentes nos efluentes dos tanques de criação, contaminando rios, lagoas e lençóis freáticos [9,10].

Estudos para quantificação de hormônios por técnicas eletroanalíticas são pouco encontrados na literatura. Estas técnicas têm suas vantagens quando comparada a outras técnicas, como o baixo tempo de análise emitindo resultado de maneira mais rápida, determinação do analito de interesse *in situ*, sem o uso de solventes tóxicos e baixo custo quando comparado a métodos analíticos tradicionais como as técnicas cromatográficas (líquida e gasosa) e espectroscopia de massas acoplado a ela [9,10].

### **3.2 Voltametria de onda quadrada**

A voltametria consiste na medida da corrente elétrica, observada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, resultante da concentração do analito de interesse controlada por um potencial externo. Estas medidas ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho e em uma célula eletroquímica sendo empregada para a determinação de mecanismos de transferência de elétrons em superfícies modificadas de eletrodos, processos redox em vários meios e processos de adsorção em superfícies, fornecendo ao analista diferentes informações relativas ao analito [11,12,13].

Como já foi dito, técnicas voltamétricas tem como principais vantagens o baixo custo instrumental, possibilita o emprego *in situ*, alta sensibilidade, velocidade das determinações, sem a necessidade de qualquer tipo de limpeza ou pré-tratamento da amostra evitando o uso de solventes e relação direta da corrente com a concentração do analito [13]. Os avanços na eletrônica e informática levaram ao desenvolvimento destas técnicas e à limites de detecção similares aos das técnicas instrumentais mais tradicionais, aumentando os estudos e demandas sobre tais técnicas [11].

Na voltametria a aplicação de um potencial sobre um eletrodo de trabalho corresponde à resposta em termos de corrente elétrica do sistema, uma relação direta das medidas. Esta corrente é composta do somatório das componentes faradaicas e não faradaicas (ou capacitiva). A primeira deriva um gráfico potencial *versus* corrente chamado de voltamograma, resultante na mudança do estado de oxidação da espécie eletroativa e corresponde a lei de Faraday. A segunda componente, correntes não



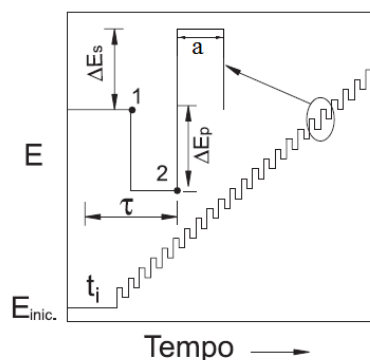
faradaicas de origem cinética, quando a transferência de elétron não possui uma velocidade suficientemente grande e termodinâmica ocorrendo durante o processo redox quando o elétron não possui energia suficiente para atravessar a dupla camada [12].

Para reações eletródicas se faz necessário que o transporte de massa do seio da solução para a superfície do eletrodo seja obrigatoriamente de maneira contínua, para que na superfície do eletrodo a concentração da espécie eletroativa se mantenha constante, evitando uma relação de corrente e concentração do analítico no seio da solução não verdadeira. O transporte de massa contínuo do seio da solução até a superfície do eletrodo de maneira espontânea gera um gradiente de concentração resultando em um fluxo por difusão da superfície do eletrodo para o seio da solução. Este transporte é denominado como transporte de massa por difusão o único considerado em voltametria oriundo da corrente dos processos de oxidação e redução e pela transferência de carga que ocorrem na interface do eletrodo-solução [13].

Existem outros dois tipos de transportes de massas por convecção que ocorre devido ao movimento físico seja ele por agitação mecânica, borbulhamento de gás ou devido um gradiente de densidade. O transporte de massa por migração ocorre devido a movimentos de atração ou repulsão pelas espécies iônicas presente na solução. Estes dois tipos de transportes de massa são evitados com a ausência de agitação, borbulhamento e com a adição de um excesso de sal inerte atenuando o campo elétrico por meio do aumento da condutividade da solução [12].

A voltametria de onda quadrada possui uma melhor intensidade de corrente, perfil voltamétrico e velocidade de leitura quando comparada a outras técnicas voltamétricas e limites de detecção comparados aos das técnicas espectroscópicas e cromatográficas. Sendo possível também a avaliação da cinética da reação [11,13].

Apresentando perfil bem definido e curvas de corrente-potencial simétricas, as medidas de corrente são realizadas ao final de cada semi-período e as variações em um determinado intervalo de potencial são constantes para altura e largura do pulso de potencial. Como mostrado na FIG 3.2.1, sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada denominada pela amplitude  $\Delta E_s$  uma onda quadrada simétrica de amplitude  $\Delta E_p$  de largura  $a$  e período  $\tau$  é aplicada no eletrodo de trabalho reação [11,13].



**Figura 3.2.1:** Método de ação do potencial na voltametria de onda quadrada (Pacheco e col.)

### 3.3 Métodos voltamétricos

Eletrodo de diamante dopado com boro foi utilizado por Santos e col. (2010), para determinação do hormônio estriol, que é um sensível indicador do bem-estar da placenta/feto durante a gravidez, por voltametria de onda quadrada em matrizes de urina. limites de quantificação e detecção de  $8,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente em um intervalo linear de  $2,0 \times 10^{-7}$  a  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

Este método foi comparado à metodologia proposta com teste de radioimunoensaio, com erro relativo de 7,29% para determinação do fármaco em produtos comerciais e de 4,98% em amostras de urina de gestantes [16].

Em 1984, Joseph Wang e col., estudaram a testosterona,  $17\alpha$ -metiltestosterona e progesterona com eletrodo de gota de Mercúrio por diferentes técnicas voltamétricas em comprimidos, com baixos limites de detecção e coeficientes de correlação superiores a 0,99 [17].

Estudo do comportamento do levonorgestrel, um fármaco usado em contraceptivos hormonais de segunda geração, foi avaliado por Ghoneim e col. (2004), em comprimidos e no sangue humano por voltametria, utilizando eletrodo de Mercúrio com limites de detecção e quantificação de  $6,7 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  e  $4,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente [18].

Métodos e estudos que utilizam técnicas voltamétricas para determinar  $17\alpha$ -metiltestosterona são dificilmente encontrados. Miranda e col. (2014), utilizaram eletrodo de gota de mercúrio para validar a  $17\alpha$ -metiltestosterona em água naturais por voltametria

de onda quadrada com limite de detecção de  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e limite de quantificação de  $3,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  [9,10].

A maior desvantagem do eletrodo de mercúrio é sua toxicidade. O mercúrio é transformado no metilmercúrio pelos microrganismos e se acumula em peixes, moluscos e naqueles que os consomem, humanos, no processo de biomagnificação. O metilmercúrio pode causar distúrbios às funções cerebrais da criança em desenvolvimento criando déficits de atenção, memória, habilidade de linguagem, motoras e visuais. Com o passar dos anos a busca por eletrodos com elementos menos danosos ao meio ambiente aumentou, tais como ouro, platina, bismuto, estanho, antimônio [19-21].

No ano de 2000, o eletrodo de filme de bismuto foi proposto como uma alternativa de substituição do eletrodo de mercúrio, com a baixa toxicidade do bismuto e seus sais ao meio ambiente. A vantagem analítica em análises voltamétricas dos eletrodos de filme de bismuto é sua alta sensibilidade, grande faixa na região anódica e sua insensibilidade com o oxigênio dissolvido na solução analisada [21].

Em 1959 pesquisadores estudaram alternativas para a substituição de eletrodos de gota de mercúrio. Uma mistura de solventes e carbono foi realizada para se obter uma dispersão-suspensão aplicável para regiões positivas, e este eletrodo foi chamado de eletrodo de pasta de carbono. Com o passar dos anos os solventes foram substituídos por óleos minerais (Nujol) e parafinas em geral [22].

A combinação de diferentes compostos oferece a possibilidade de melhorar a sensibilidade, seletividade, estabilidade, possibilidade de renovação de superfície mantendo as propriedades originais [23]. Estes eletrodos possuem diversas vantagens, pois podem ser fabricados de diferentes tamanhos, forma, quimicamente modificados, podem ser utilizados em diferentes solventes, resistentes em grande faixa de pH e larga faixa de potencial [24,25].

A composição do eletrodo pode ser realizada por eletrodeposição em superfície de eletrodos e pela mistura de componentes na composição em massa gerando um ganho nas eletroanálises [26]. O alto transporte de massa geram maior sensibilidade e reprodutibilidade, fatores levados em consideração para a escolha de um eletrodo de trabalho e técnica utilizada [11].

Eletrodos de carbono vêm sendo amplamente utilizados nos últimos anos na eletroanalítica, por causa da sua facilidade em sua fabricação, baixa corrente de fundo, ampla faixa de potencial, superfície rica quimicamente, podem ser moldados em

diferentes tamanhos e formas e, em contra partida, possuem uma taxa de transferência de elétrons muito lenta comparado aos eletrodos de metal. Os compostos mais comuns usados com o grafite são óleos de parafina e óleos de silicone. Ponteiras de pipetas e seringas podem servir de suportes para estes eletrodos feitos de maneira artesanal [12].

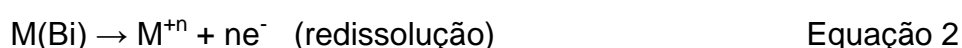
Na literatura há poucos estudos para a determinação de metiltestosterona por técnicas eletroanalíticas. Levantamento feito na base Web of Science (ISI) revelou que somente cinco trabalhos foram encontrados utilizando-se palavras chave como *methyltestosterone*, *electrochemical* ou *electrode*, indicando a necessidade de estudos visando esta técnica analítica. Para isto, foram avaliados eletrodos modificados recobertos com bismuto; reação da metiltestosterona com nitroprussiato de sódio e reação com permanganato em meio básico.

### 3.4 Estudo da utilização de eletrodo de filme de bismuto

A voltametria de redissolução constitui na remoção oxidativa ou redutora de átomos, íons ou compostos de uma superfície do eletrodo. Este método possui duas etapas: o acúmulo na superfície do eletrodo do analito de interesse, dissolvido na solução, e a segunda etapa consiste na remoção desta substância acumulada mediante técnicas voltamétricas, potenciométricas ou coulométricas [13,27].

A primeira etapa também pode ser chamada de etapa de pré-concentração, pois antes da varredura e aquisição do sinal se iniciar ocorre a reação eletroquímica entre o eletrodo de trabalho e o analito. A pré-concentração ocorre com condições controladas e reprodutíveis, durante um determinado período sob aplicação de um potencial controlado [13].

A segunda etapa é conhecida como etapa de redissolução, nesta etapa é realizada uma varredura de potencial na qual o analítico é redissolvido para a solução. Esta varredura pode no sentido anódico (positivo) e catódico (negativo), a voltametria de redissolução anódica é a mais comum [13]. Nas Equações 1 e 2 são representadas as etapas de pré-concentração e redissolução para íons metálicos em eletrodo de filme de Bismuto.



Sendo que  $M^{+n}$  é o metal de interesse e M(Bi) a liga metálica de Bismuto e o metal.

A análise por voltametria de redissolução é utilizada para análise em nível de traço, porque nesta análise existem duas condições linearmente independentes, a atividade da substância acumulada e a concentração do analito na amostra, e a segunda é entre a corrente máxima de remoção e a atividade acumulada da substância. Assim existe uma relação linear cumulativa entre a resposta máxima do sinal analítico e a concentração do analito. A capacidade do eletrodo de adsorver o analito de interesse é limitada, pois a linearidade é satisfeita para condições abaixo da saturação do eletrodo [13].

Estas análises podem ser realizadas por meio da curva de adição de padrão, com pequenas e conhecidas adições de padrão. A concentração do analito presente na amostra é determinada mediante da extrapolação da regressão linear no eixo de concentração [27].

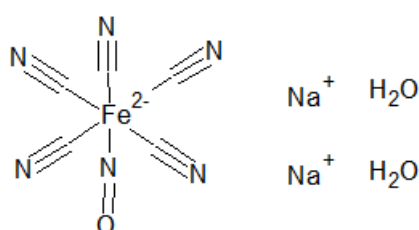
O método de revestimento do bismuto no substrato é importante para o desempenho do eletrodo de compósito, condições de deposição especialmente potencial, tempo, solução de deposição, a concentração de bismuto e também o substrato a ser depositado estão diretamente relacionados à estrutura do filme de Bismuto. O controle do pH é de suma importância, visto que, em meio alcalino ocorre a hidrólise do íon bismuto [28].

No trabalho apresentado por Agnieszka e col. (2014), estudou-se a deposição do filme de bismuto em eletrodo de carbono vítreo para a determinação do corante amarelo crepúsculo em bebidas, com limites de quantificação e determinação de  $4,4 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. Foi necessário realizar um pré-tratamento na amostra para evitar interferentes presentes na matriz [29].

No trabalho de revisão elaborado por Barbara Brunetti (2016), são apresentados diversos métodos para determinação de vitaminas do complexo B por técnicas voltamétricas, algumas delas com a utilização de eletrodos de filme de bismuto em diferentes substratos, com limites de detecção em parte por milhão (ppm), e em diferentes matrizes como comprimidos, sucos de frutas, urina, sangue etc [30].

### **3.5 Estudo da utilização do nitroprussiato de sódio**

O nitroprussiato de sódio ou pentacianonitrosilferrato de sódio é um composto químico de fórmula  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]_2\text{H}_2\text{O}$  como mostra a FIG. 3.2.1, com massa molar de  $261,92 \text{ g mol}^{-1}$ , sólido cristalino avermelhado nas condições ambiente, um sal fonte de óxido nítrico de forma semelhante aos nitratos orgânicos. Este sal pode ser formado pela ação do ácido nítrico sobre o ferrocianeto ou ainda com nitrito de sódio. Apresenta-se na forma de cristais ortorrômbicos o ânion nitroprussiato, que possui o íon Ferro (II) como íon metálico cercado por cinco ligantes cianeto e um ligante de óxido nítrico linear, responsável por sua atividade biológica [31].



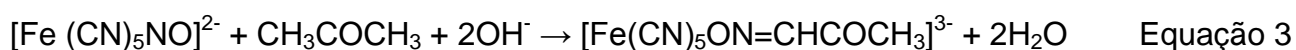
**Figura 3.5.1:** Estrutura química do Nitroprussiato de Sódio (adaptado de <http://www.chemspider.com/>, acessada em novembro de 2017)

Descoberto em 1893 por PlayFair, somente em 1929 o nitroprussiato de sódio passou a fazer parte dos compêndios de farmacologia básica e em 1955 passou a ser administrado para tratar pacientes hipertensos mostrando-se bastante eficaz. Potente vasodilatador arterial e venoso, administrado por via intravenosa em pacientes em situação de emergência hipertensiva vem sendo utilizado há mais de 40 anos. Indicado para tratamento intra e pós operatório de pacientes submetidos em cirurgias cardíacas, para produzir hipotensão controlada, para estimular o débito cardíaco, em situações que requerem redução imediata da pressão sanguínea, entre outros [32].

Os principais cuidados para o uso de Nitroprussiato de Sódio é a hipotensão que causa danos isquêmicos irreversíveis ou até a morte e o acúmulo de cianeto, o aumento da taxa de íons cianetos pode atingir níveis tóxicos e potencialmente letais. A intoxicação por íons cianetos podem ser monitorados pela concentração do oxigênio venoso e o equilíbrio ácido base. Estes íons são rapidamente transformados em tiocianato no fígado e excretados pelos rins e, quando administrados em altas doses e por longo prazo, o risco de intoxicação é maior [32,33].

Estudos mostram que a redução do ânion nitroprussiato é provocada pelo mecanismo de liberação do NO que envolve uma transferência de elétron ao ligante NO<sup>+</sup>, aumentando o interesse nas reações do Nitroprussiato de Sódio, porque quando interagido com agentes redutores, tióis e hemoproteínas, podem ser os responsáveis pelo transporte e liberação do NO *in vivo* [34].

Como método analítico, no trabalho proposto por Daniela e col. (2017), o Nitroprussiato se liga com a 17 $\alpha$ -metiltestosterona originando um composto de grupamento isonitrocetona, baseado na reação de metilcetonas com o grupo NO presente na molécula. Este complexo permanece na forma de ânion e o Ferro (II) é oxidado para Ferro (III), conforme Equação 3.



Este complexo formado também poder ser determinado por espectrofotometria de UV-Vis (Ultravioleta-visível) com absorção máxima por volta de 440 nm. Também foi apresentado um estudo teórico da formação do complexo 17 $\alpha$ -metiltestosterona com Nitroprussiato [35].

### 3.6 Estudo da utilização do permanganato de potássio

De acordo com a literatura o permanganato é um agente oxidante forte, com capacidade de oxidar compostos orgânicos [35-43].

O íon permanganato tem baixa ecotoxicidade e é um dos agentes oxidantes mais enérgicos. Por existir em vários estados de oxidação entre os quais o +7, o maior estado de oxidação presente nos óxidos MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> e Mn<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. O MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> é a espécie oxidante mais utilizadas nos estudos de cinética em meio ácido, neutro e alcalino. O mecanismo das reações envolvendo o íon permanganato é regido pelo pH do meio [38].

Estudo da cinética de oxidação da medroxiprogesterona na presença do íon permanganato foi estudado por Hevari e col., (2013). A medroxiprogesterona é um hormônio sintético derivado da progesterona, e é utilizada em contraceptivos hormonais. No trabalho citado foi estudada a cinética de oxidação por meio de um espectrofotômetro UV-Vis apresentando absorção em 609 nm na faixa de concentração de 0,2 a 4,75 mg L<sup>-1</sup>.

A cinética da reação foi estudada por um período de 1 hora e foi observada a mudança de cor da solução em virtude do consumo da espécie  $\text{MnO}_4^-$  [35].

Cheng e col. (2014) estudaram a dependência do pH do meio na cinética da oxidação do diclofenaco na presença de íon permanganato, as concentrações do fármaco utilizados e o mecanismo de formação de seus produtos de degradação foram analisados no sistema de cromatografia líquida de alto desempenho acoplado ao espectrômetro de massas. A faixa de pH estudada foi entre 6 a 9 e estudado o efeito da temperatura [37].

Também utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Ahmed e col. (2016) estudaram a cinética da reação de obtenção da 9-fluorenona com o emprego do permanganato de potássio em meio alcalino. O produto da reação foi confirmado com o auxílio de um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas. Foi avaliado o efeito da concentração dos reagentes da reação, influência da concentração de  $\text{OH}^-$ , temperatura e força iônica [39].

De maneira similar, trabalhos de Ma e col. (2011) e Liu e col. (2011), apresentam estudos para a determinação dos fármacos cloridrato de centrofenoxina e o cloridrato de buflomedil respectivamente, com a utilização do agente oxidante permanganato de potássio em meio alcalino com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis para a leitura das absorvâncias em função da concentração do fármaco estudado [41,42].

Assim, foram realizados estudos para avaliar o método mais promissor na determinação de metiltestosterona por meio de técnicas eletroanalíticas.

## **4 PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 - Materiais e Métodos**

#### **4.1.1 – Estudo com eletrodo de bismuto**

Os reagentes químicos utilizados foram de alta pureza (> 99%). A água utilizada para preparar as soluções foi água destilada e purificada por osmose reversa (ADAMO, resistência à da água:  $10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A solução padrão de  $17\alpha$ -metiltestosterona foi preparada a partir do padrão farmacêutico (100,3% de pureza) diluído em etanol (Sigma-Aldrich, 99%), na concentração de  $30,2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para os testes, tampão Acetato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  com pH de 4,5 e etanol (Sigma-Aldrich, 99%) (85:15) na célula eletrolítica.



#### 4.1.2 – Teste com nitroprussiato de sódio

A solução de nitroprussiato de potássio (Neon) (5% m/v) foi armazenada em frasco âmbar imediatamente após o preparo.

Para os testes, utilizou-se solução de hidróxido de sódio (NaOH) (Alphatec, 99%) com pH 9,5 na presença de cloreto de potássio (KCl) (LobalChemie, PA) como eletrólito de suporte.

#### 4.1.3 – Teste com permanganato de potássio

Para os testes utilizou-se solução de hidróxido de sódio (NaOH) (Alphatec, 99%) na concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e solução de permanganato de potássio (Neon) na concentração de  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 4.2 - Equipamentos

Utilizou-se micropipeta (Labmate,  $\pm 0,82\%$ ) para as adições do hormônio na célula eletroquímica. O pH das soluções foi ajustado com pHmetro LABMETER PHS-3B (resolução  $\pm 0,01$ ) e eletrodo de vidro combinado, calibrado com soluções tampão pH 7,0 ( $\pm 0,05$ ) e pH 4,0 ( $\pm 0,02$ ). O espectrofotômetro de feixe duplo Shimadzu UV-1800 foi utilizado para avaliar a absorbância e comprimento de onda da banda de absorção característica do complexo formado. O potenciostato utilizado foi o modelo 273A da marca EG&G.

### 4.3 - Metodologias

#### 4.3.1 – Preparo e estudo do eletrodo de bismuto

O filme de Bismuto foi depositado na superfície do substrato pelo método *ex situ* ou prédeposição, utilizando-se 50 mL de solução na célula eletrolítica, contendo  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  de nitrato de bismuto,  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  de citrato de sódio (eletrólito) e  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico, com potencial de deposição de  $-0,18 \text{ V}$  por 200 segundos.

Após a formação do filme de Bismuto, o eletrodo foi lavado com água deionizada e transferido para uma solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com pH de 4,5 e etanol (85:15 v/v) para a célula eletroquímica. Após a leitura da solução do branco, adicionou-se alíquotas da solução padrão de  $17\alpha$ -metiltestosterona. O eletrodo de referência utilizado foi o de Ag|AgCl|KCl saturado e o eletrodo auxiliar de platina.

#### 4.3.2 Preparo do eletrodo de grafite

O eletrodo de grafite foi desenvolvido a partir da queima do grafite por 3 horas a 500°C sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub> e o pó obtido é misturado com Nujol<sup>®</sup> até formar uma pasta homogênea que foi preenchida no corpo de uma seringa hipodérmica de 5,0 mL, com 0,2 cm de altura com fio de cobre para o contato elétrico. Esta mistura foi prensada até compactação, com sua superfície nivelada com a borda e a superfície de contato foi polida com o auxílio de folha de papel. O eletrodo de referência utilizado foi o de Ag|AgCl|KCl saturado e o eletrodo auxiliar de platina. Nos testes exploratórios foi utilizado também o eletrodo de carbono vítreo comercial.

#### 4.3.3 – Estudo do nitroprussiato de sódio

A solução de nitroprussiato de sódio (5% m/v) foi preparada em meio alcalino, com 0,5 mol L<sup>-1</sup> de KCl como eletrólito de suporte. A solução padrão de 17α-metiltestosterona foi preparada com a massa necessária do hormônio solubilizada em 1,0 mL de Etanol com concentração final de 0,1 mol. L<sup>-1</sup>. Em seguida, esta solução foi diluída em solução alcalina de hidróxido de sódio com pH 9,5 com concentração final de 5,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> do hormônio. Na célula eletroquímica com 50,0 mL de solução de nitroprussiato de sódio em meio alcalino foram adicionados alíquotas da solução padrão de MT para os testes.

#### 4.3.4 – Estudo do permanganato de potássio

A solução padrão de 17α-metiltestosterona foi preparada transferindo-se 1,0 mg para um balão volumétrico de 50 mL contendo cerca de 40 mL de água destilada, solubilizando-se todo analito e foi completado o volume do balão com o mesmo diluente. Transferiu-se 0,5 mL da solução de KMnO<sub>4</sub> 5,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> e 0,5 mL da solução NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> para um balão volumétrico de 10 mL e foi preparada a curva analítica com a adição da solução de padrão de MT, completado com água destilada, realizando-se as medidas voltamétricas.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos utilizando-se eletrodo de bismuto

O bismuto possui inúmeras vantagens em análises voltamétricas com grande faixa na região anódica, alta sensibilidade, sendo uma ótima alternativa para substituição

do mercúrio. Assim, o bismuto foi utilizado para a formação de um filme sobre o substrato de cobre para análise de MT em solução, por meio da técnica de voltametria por redissolução.

O primeiro desafio foi formar o filme de bismuto sobre na superfície do fio de cobre. Foi utilizada uma solução ácida para evitar a hidrólise do bismuto e conseqüentemente a não deposição do filme na superfície de cobre.

A deposição do filme de bismuto foi realizada por meio de potenciais controlado por período de acordo com a TAB 5.1.1. Os testes foram realizados em meio ácido de solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 5.1.1:** Testes realizados no meio de solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> com alteração do potencial e tempo de deposição

Teste	Potencial de deposição (mV)	Tempo de deposição (s)
1	-1200	300
2	-800	120
3	-200	300
4	-180	200
5	-150	200

Em todas as condições testadas foram observadas o surgimento de bolhas provenientes da oxidação da água gerando gás oxigênio, com isso a superfície do filme formado não se apresentou uniforme. Para que exista uma boa repetitividade a superfície do eletrodo precisa se apresentar de maneira uniforme na formação do filme, obtendo erros menores na quantificação do analito de interesse, quando analisados com diferentes eletrodos.

A condição de -150 mV de potencial de deposição e 200 segundos de deposição foi a que menos se observou formação de bolha na superfície do eletrodo formado e, conseqüentemente, melhor filme depositado.

Foram realizados testes com a utilização do tampão acetato pH 4,5 para a deposição do filme de bismuto. Na TAB. 5.1.2 são apresentadas as alterações realizadas com a utilização do tampão.

**Tabela 5.1.2:** Testes realizados no meio de solução de CH<sub>3</sub>COONa 0,05 mol L<sup>-1</sup> com alteração do potencial e tempo de deposição

<b>Teste</b>	<b>Potencial de deposição (mV)</b>	<b>Tempo de deposição (s)</b>
1	-1200	300
2	-800	120
3	-200	300
4	-180	200
5	-150	200

A condição de potencial de deposição de -1200 mV com 300 segundo foi a que apresentou maior formação de bolhas na superfície do eletrodo e também não apresentou a formação do filme de bismuto. Também foi observada a formação de bolhas na condição de potencial de deposição de -800 mV.

Nas demais condições testadas não observou-se a evolução de gás oxigênio, e foi observado formação do filme de bismuto. No teste 3 foi observada a formação de múltiplas camadas não apresentando uma camada uniforme. A condição que se obteve a melhor formação do filme de bismuto foi o teste 4 com potencial e tempo de deposição de -180 mV por 200 segundos

Posteriormente à formação do filme foi aplicada a técnica de voltametria de redissolução para realizar a determinação do hormônio de interesse. A MT foi pré-concentrada na superfície do eletrodo de filme de bismuto, com objetivo de aumentar o sinal de corrente de potencial gerado e, conseqüentemente, diminuindo o limite de detecção. Esta etapa foi realizada variando-se do tempo e potencial de acordo com a (TAB. 5.1.3).

**Tabela 5.1.3:** Testes realizados para a pré-concentração da MT na superfície do eletrodo com alteração do potencial e tempo

Teste	Potencial de deposição (mV)	Tempo de deposição (s)
1	-800	120
2	-800	300
3	-500	120
4	-500	300
5	-800	120
	-800	300
	-800	
	-500	
	-400	200
	-300	
	-200	

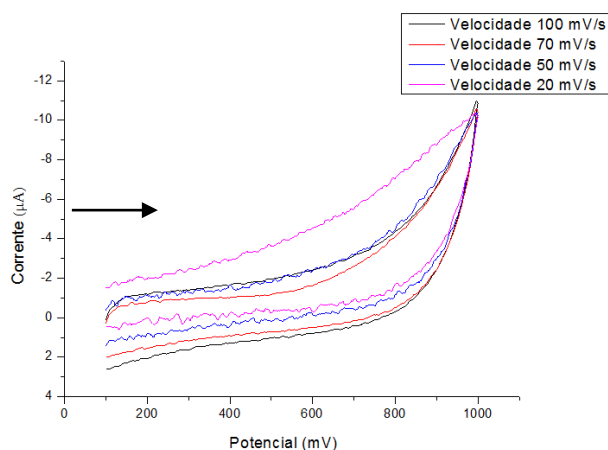
Após estes testes de pré-concentração, foi realizada uma varredura de potencial catódica no qual o analito é redissolvido para a solução. Em todos os testes realizados não foram observados o surgimento de pico de potencial. Para testes realizados com filme de bismuto utilizando técnica de voltametria de redissolução a 17 $\alpha$ -metiltestosterona não se mostrou uma espécie eletroativa.

## 5.2 Estudos utilizando-se nitroprussiato de sódio

Os testes utilizando-se nitroprussiato de sódio para a determinação de MT foram realizados em solução alcalina de hidróxido de sódio de concentração de  $5,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de pH 9,5. Conforme citado no trabalho realizado por Miranda e col. (2014), nesta faixa de pH foi observado uma maior intensidade de corrente da 17 $\alpha$ -metiltestosterona quando comparada a diferentes pH e soluções.

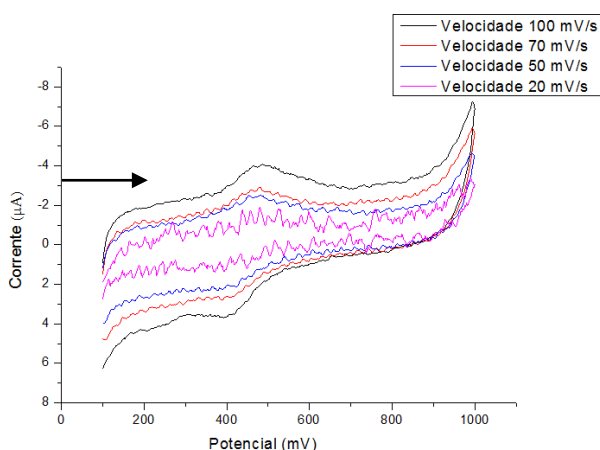
No estudo eletroquímico, a varredura de potencial foi entre 0,1 a 1,1 V variando-se o pulso de potencial e frequência de varredura com o objetivo de determinar a melhor condição de maior intensidade de sinal. Foram utilizados os eletrodos de carbono vítreo e grafite com nujol para a escolha do eletrodo mais sensível, isto é, com maior resposta de corrente.

Na FIG. 5.2.1 é mostrado o voltamograma das diferentes velocidades de varredura da solução branco, contendo cloreto de potássio (eletrólito suporte) em meio alcalino e NaOH de pH 9,5.



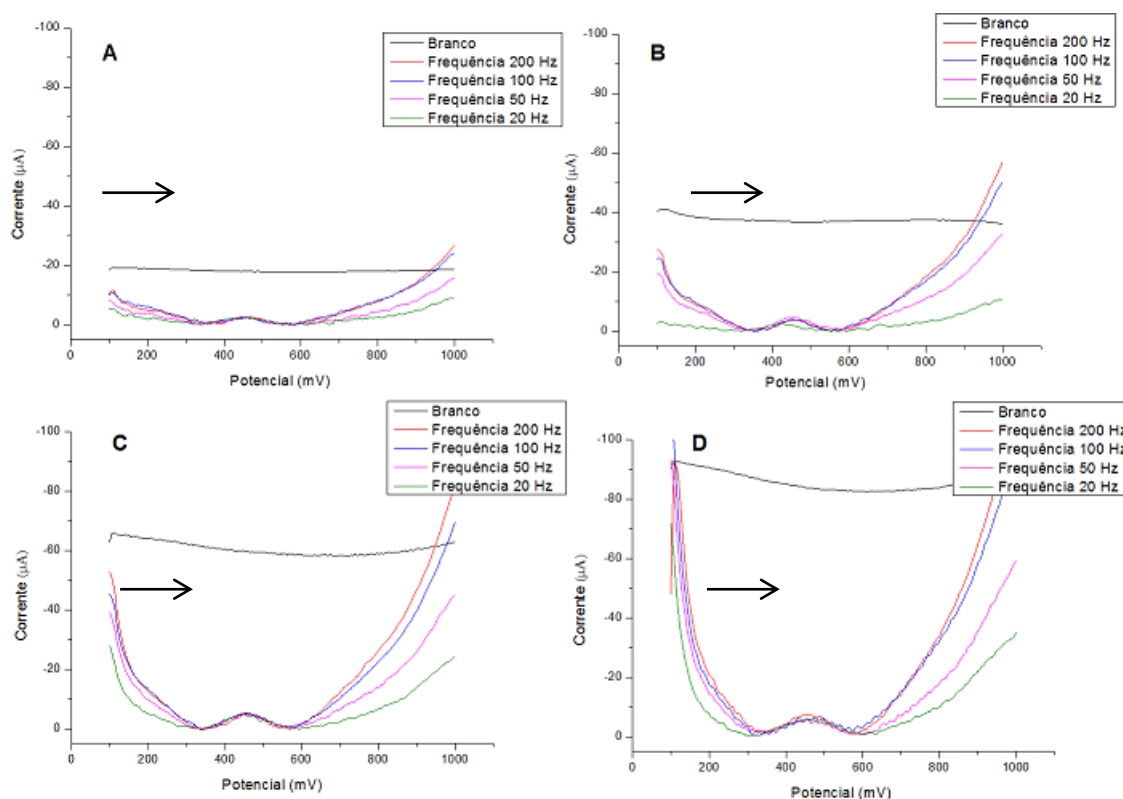
**Figura 4.3.4:** Voltamograma da voltametria cíclica da solução branco com diferentes velocidades de varredura de 20, 50, 70, 100 mV/s e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura

Pode-se notar que existe pico de potencial por volta de 1,0 V, provavelmente, proveniente da oxidação da água. Na sequência foi realizada a voltametria cíclica com a solução de nitroprussiato de sódio em solução alcalina na presença do eletrólito suporte mantendo-se o potencial e variando a velocidade de varredura, a fim de escolher os parâmetros mais adequados. Na FIG. 5.2.2 é mostrado o voltamograma deste teste.



**Figura 5.2.2:** Voltamograma de voltametria cíclica da solução nitroprussiato com diferentes velocidades de varredura de 20, 50, 70, 100 mV/s e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura

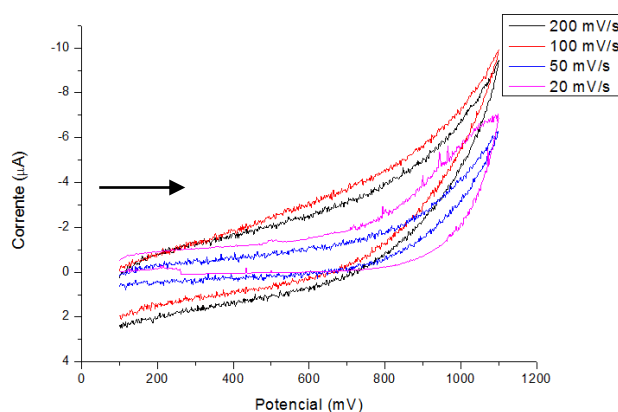
Nota-se o pico de potencial anódico em 0,486 V e pico de potencial catódico em 0,394 V referente ao nitroprussiato, com diferença de 92 mV indicando 1,5 elétrons no processo eletroquímico, encontrado em estudos de moléculas orgânicas. A partir destes resultados, foram realizados testes por voltametria de onda quadrada com o objetivo de avaliar a sensibilidade do eletrodo. Nos voltamogramas apresentados na FIG. 5.2.3 foram avaliados o pulso de potencial de 25, 50, 70 e 100 mV em diferentes frequências de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz mantido o incremento de potencial de 2 mV.



**Figura 5.2.3:** Voltamograma de voltametria de onda quadrada da solução nitroprussiato com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, incremento de potencial de 2 mV e diferentes pulso de potencial e frequência: A – pulso de potencial de 25 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz, B - pulso de potencial de 50 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz, C - pulso de potencial de 70 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz. D - pulso de potencial de 100 mV e frequência de aquisição de 20, 50, 100 e 200 Hz. A seta indica o sentido de varredura

De acordo com os testes realizados não houve alteração significativa na intensidade de potencial com a alteração de frequência de aquisição, quando analisados na mesma condição de pulso de potencial. Mas comparando-se os estudos de alteração de pulso de potencial foi observado um ligeiro aumento de 6,10  $\mu\text{A}$ , na intensidade de corrente na condição de pulso de potencial de 100 mV, a qual foi escolhida para os testes.

Os primeiros testes com o eletrodo de grafite foram realizados nas mesmas condições do teste com eletrodo de carbono vítreo. Foi realizado a voltametria cíclica com a mesma solução branco, preparada com NaOH de concentração de pH 9,5 com o eletrólito suporte (KCl), mantendo-se o potencial de varredura de 0,1 a 1,1 V variando a velocidade de varredura de 20, 50, 100 e 200  $\text{mV s}^{-1}$ , como mostrado na (FIG. 5.2.4).

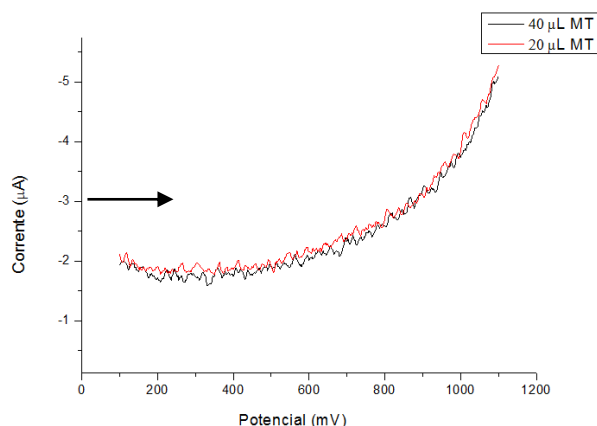


**Figura 5.2.4:** Voltamograma de voltametria cíclica da solução nitroprussiato com diferentes velocidades de varredura de 20, 50, 100, 200  $\text{mV/s}$  e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura

Neste teste também foi notado o pico de potencial de oxidação da água por volta de 1,1, e como no teste anterior em que se utiliza o eletrodo de carbono vítreo, não foi observado pico de potencial de nenhuma espécie, além do pico de potencial da água já citado.

Com o objetivo de verificar se a 17 $\alpha$ -metiltestosterona é uma espécie eletroativa na ausência do nitroprussiato, adições de 20  $\mu\text{L}$  de solução padrão de MT de concentração de 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  em Etanol foram adicionadas na célula eletrolítica com varredura por voltametria de onda quadrada com faixa de potencial de 0,1 a 1,1 V, frequência de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de potencial de 2 mV. Na FIG. 5.2.5 é apresentado o voltamograma das adições da solução padrão de MT.

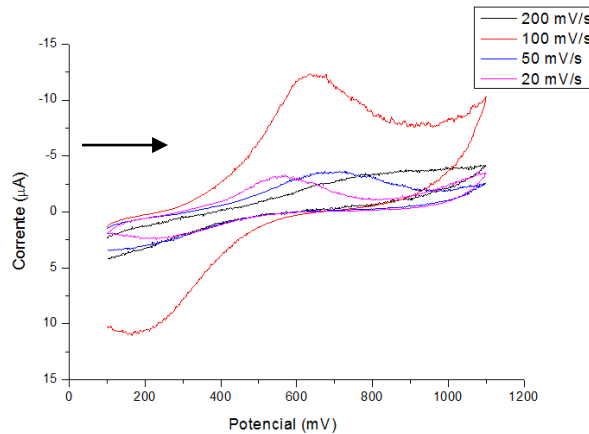




**Figura 5.2.5:** Voltamograma de voltametria de onda quadrada da Solução Branco com adições de 20 e 40  $\mu\text{L}$  da Solução Padrão de 17 $\alpha$ -metiltestosterona com frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de potencial de 2 mV e potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V. A seta indica o sentido de varredura

Como demonstrado no voltamograma na FIG. 5.2.5 o analito de interesse não apresenta pico de potencial na região analisada, isto é, a 17 $\alpha$ -metiltestosterona não é uma espécie eletroativa nestas condições e com o uso destes eletrodos de trabalho em questão. O mesmo teste foi realizado com o eletrodo de carbono vítreo, apresentando o mesmo resultado. Assim, faz necessária a determinação da MT com a utilização destes eletrodos de maneira indireta, a partir da formação de complexo com o nitroprussiato.

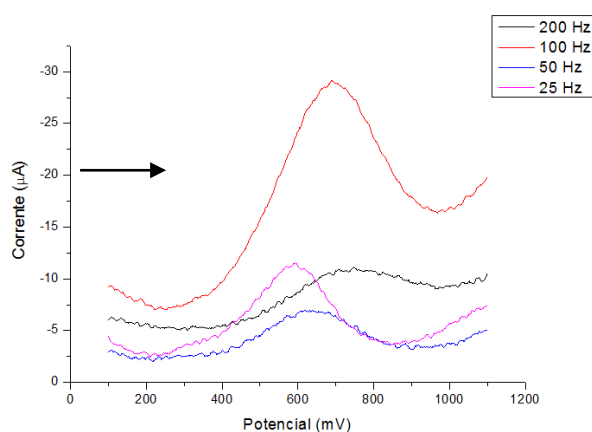
Na sequência realizou-se testes de voltametria cíclica com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, variando-se a velocidade de varredura de 20, 50, 100 e 200  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , da solução de nitroprussiado de sódio em meio alcalino na presença de KCl, como mostrado na (FIG. 5.2.6).



**Figura 5.2.6:** Voltamograma de voltametria cíclica com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V da Solução de nitroprussiato de sódio em meio alcalino na presença de KCl variando a velocidade de varredura de 20, 50, 100 e 200  $\text{mV s}^{-1}$ . A seta indica o sentido de varredura

A solução de nitroprussiato de sódio apresentou pico de potencial em 0,65 V, e em  $100 \text{ mV s}^{-1}$  de velocidade de varredura a condição na qual o pico de potencial apresentou maior intensidade de corrente quando comparado com os outros.

Na FIG. 5.2.7, estão apresentados os resultados da voltametria de onda quadrada com a mesma solução de nitroprussiato de sódio com o potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, pulso de potencial de 100 mV e incremento de potencial de 2 mV, variando-se as frequências de aquisição de 25, 50, 100 e 200 Hz.

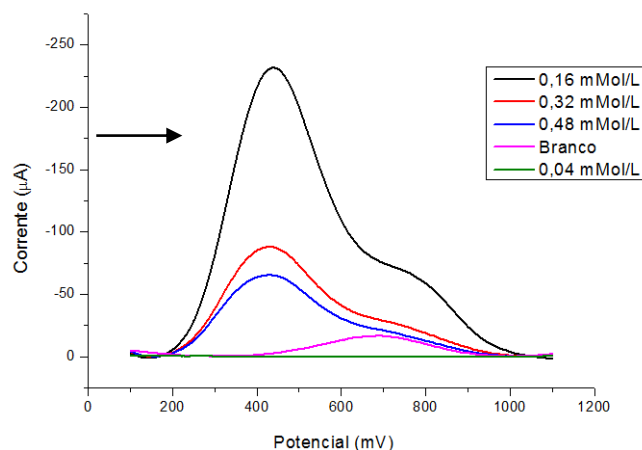


**Figura 5.2.7:** Voltamograma de voltametria de onda quadrada da solução de nitroprussiato de sódio em meio alcalino na presença de KCl com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, pulso de potencial de 100 mV, incremento de potencial de 2 mV e nas frequências de aquisição de 25, 50, 100 e 200 Hz. A seta indica o sentido de varredura

A partir destes resultados comparou-se os resultados da voltametria de onda quadrada da solução de nitroprussiato de sódio em meio alcalino na presença de KCl com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, pulso de potencial de 100 mV, incremento de potencial de 2 mV com frequência de aquisição de 100 Hz do eletrodo de carbono vítreo e o eletrodo de grafite. Portanto, foi escolhido o eletrodo de grafite como sendo o melhor eletrodo de trabalho, isto é, o que apresentou a maior sensibilidade para intensidade de corrente para a determinação de nitroprussiado. O pico de potencial do nitroprussiato na condição escolhida foi observado em 690 mV.

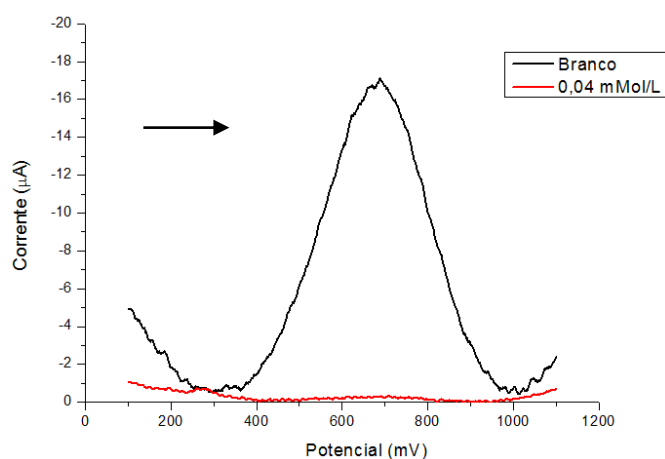
Adicionalmente fixou-se o potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, o incremento de potencial de 2 mV, o pulso de potencial de 100 mV e a frequência de aquisição de 100 Hz para as análises de voltametria de onda quadrada, visto que foram as melhores condições com maior intensidade de corrente apresentadas nos testes citados.

Em seguida foi realizada uma curva de adição de padrão com adições sucessivas de volumes da solução padrão de MT de 20, 60, 80 e 80  $\mu\text{L}$  com concentração final na célula eletrolítica de 0,04, 0,16, 0,32, 0,48  $\text{mmol L}^{-1}$  respectivamente, e aplicada voltametria de onda quadrada com frequência de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV, incremento de potencial de 2 mV com varredura de potencial de 0,1 a 1,1 V, após cada adição do analito. Na FIG. 5.2.8 são apresentados os voltamogramas adquiridos após cada adição da solução padrão de MT.



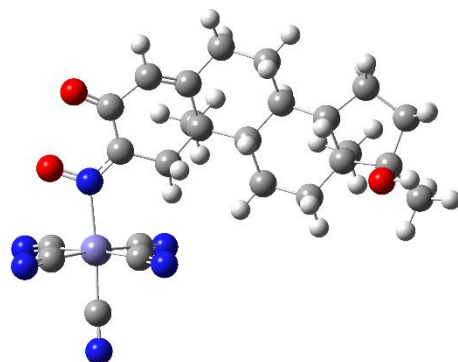
**Figura 5.2.8:** Voltamograma da voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 1,1 V, frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV, da curva de adição de padrão com volumes de adição de 20, 60, 80 e 80  $\mu\text{L}$  da Solução Padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura

É possível observar o surgimento do pico de potencial em 430 mV proveniente do complexo formado da 17  $\alpha$ -metiltestosterona com o nitroprussiato. Nota-se que após a adição de 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão de MT não foi observado o surgimento de pico de potencial na região de 430 mV, como demonstrado na FIG. 5.2.9, e também após a adição não é observado pico de potencial característico do nitroprussiato na região de 690 mV, levando a crer em um consumo da espécie nitroprussiado na superfície do eletrodo.



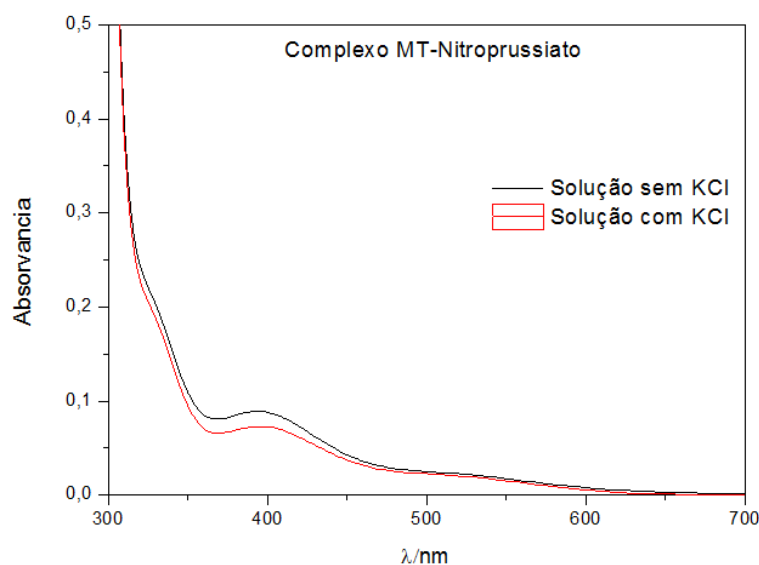
**Figura 5.2.9:** Voltamograma da voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV, da curva de adição de padrão com o volume de adição de 20  $\mu\text{L}$  da solução padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura

Como dito, a 17  $\alpha$ -metiltestosterona na presença de nitroprussiato incide na formação do complexo MT-nitroprussiato, que ocorre por meio do ataque ao grupo NO no carbono alfa da carbonila é uma reação de formação de estequiometria de 1:1, confirmado por cálculos teóricos da excitação eletrônica desta ligação, estudado por Daniela e col. (2017). Na FIG. 5.2.10 é mostrado a estrutura otimizada do complexo.



**Figura 5.2.10:** Complexo formado de MT-Nitroprussiato (água implícita)

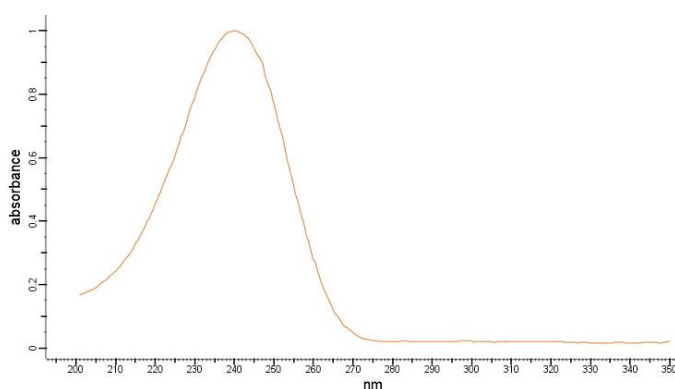
A fim de se verificar a influência do eletrólito suporte na formação do complexo, foi realizada também uma análise comparativa do espectrofotômetro UV-Vis. Na FIG. 5.2.11 é mostrado um comparativo do espectro de absorção da formação do complexo em duas soluções de nitroprussiato de sódio e adição de 0,48 mmol L<sup>-1</sup> da solução padrão de MT em meio alcalino, diferindo somente quanto ao eletrólito suporte, com e sem KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 5.2.11:** Espectro de absorvância UV-Vis da solução do complexo formado entre nitroprussiato e metiltestosterona com e sem a adição de KCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

A formação do complexo MT-nitroprussiado possui absorção máxima em 400 nm, e pode-se observar diminuição na absorvância de 17% na presença do eletrólito suporte, havendo indicativos de competição do eletrólito suporte com a  $17 \alpha$ -metiltestosterona para a formação do complexo.

Adicionalmente na FIG 5.2.12 é apresentado o espectro de absorvância de UV-Vis da  $17 \alpha$ -metiltestosterona o qual apresenta o máximo de absorvância na região de 250 nm, confirmando o complexo formado com a adição do nitroprussiato de sódio.



**Figura 5.2.12:** Espectro de absorvância UV-Vis da  $17 \alpha$ -metiltestosterona (adaptado de <https://spectrabase.com> acessado em 20/10/2018)

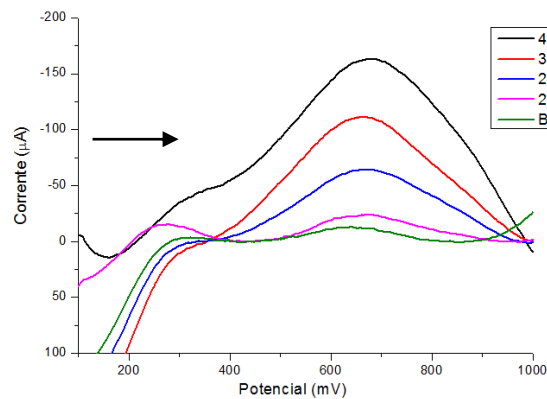
### 5.3 Estudos utilizando-se permanganato de potássio

Na TAB. 5.3.1 são apresentados os volumes, as concentrações finais das soluções e o sinal analítico em corrente de cada solução.

**Tabela 5.3:1:** Volume adicionado, concentração de MT e resposta em corrente da curva da solução padrão de MT

Volume adicionado ( $\mu\text{L}$ )	Concentração de MT ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
0	Branco	11,71
90	2,16	24,26
110	2,64	64,26
130	3,12	110,88
170	4,08	163,11

Na FIG. 5.3.1 são apresentados os voltamogramas das varreduras com diferentes concentrações.

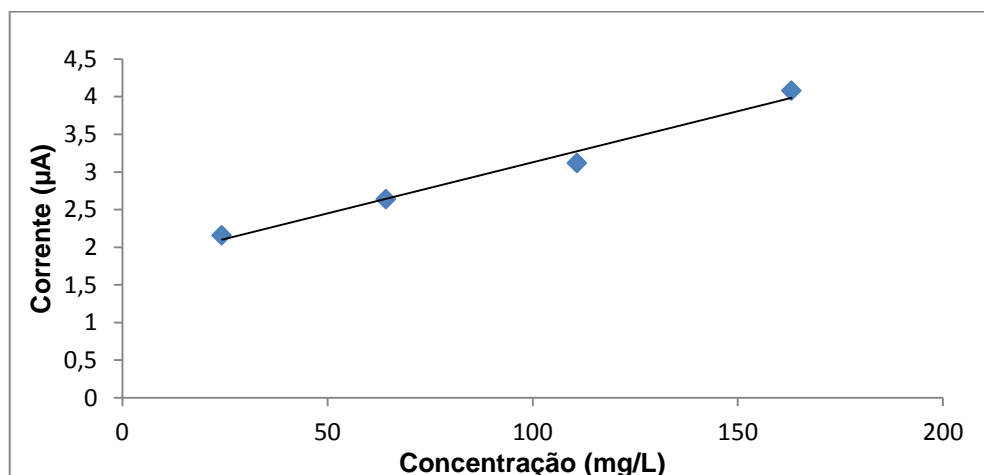


**Figura 5.3.1:** Voltamograma da voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 1,0 V, frequência de aquisição de 100 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV da curva de adição de padrão da solução padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura

Na região de 674 mV é evidente que existe correlação linear da resposta de corrente de potencial com as adições da solução padrão de MT o que leva a entender que o pico de potencial observado é derivado do produto da reação redox, a espécie oxidada.

Próximo a 260 mV é notado outro pico de potencial que possivelmente pode ser atribuído ao do íon permanganato em excesso na solução.

A partir destes resultados foi feita a curva de concentração *versus* corrente, apresentada na (FIG. 5.3.2).

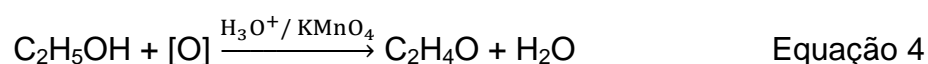


**Figura 5.3.2:** Curva de adição de padrão da solução padrão de MT vs corrente ( $y = 0,0136x + 1,7711$  e  $R^2 = 0,9817$ )

Como pode ser visto os resultados apresentaram correlação linear visto que o valor de  $R^2$ , o coeficiente de determinação é próximo de 1.

Nos dados apresentados na TAB. 5.3.1, observou-se corrente na solução branco. Este pico de corrente pode estar relacionado a uma contaminação no momento do preparo de amostras, uma possível interferência do etanol utilizado para a solubilização do analito.

Com base na literatura o mecanismo de atuação do íon permanganato é por meio da oxidação, neste caso, de espécies orgânicas. O etanol pode-se oxidado a aldeído acético na presença do íon permanganato em meio ácido como apresentado na Equação 4.

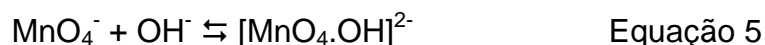


Assim, o pico de potencial observado na solução branco pode ser proveniente do etanol utilizado na solubilização do analito na solução padrão. A partir disto a



solubilização da MT e o preparo da solução padrão foi alterada, utilizando-se somente água com diluente.

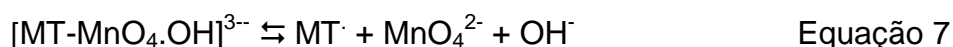
O mecanismo e a cinética da reação do permanganato em solução alcalina foram estudada por Fawzy e col. (2014), como demonstrada na Equação 5, sendo a primeira etapa em meio alcalino, no qual o íon permanganato se liga ao íon OH<sup>-</sup>, formando a espécie alcalina [MnO<sub>4</sub>.OH]<sup>2-</sup>.



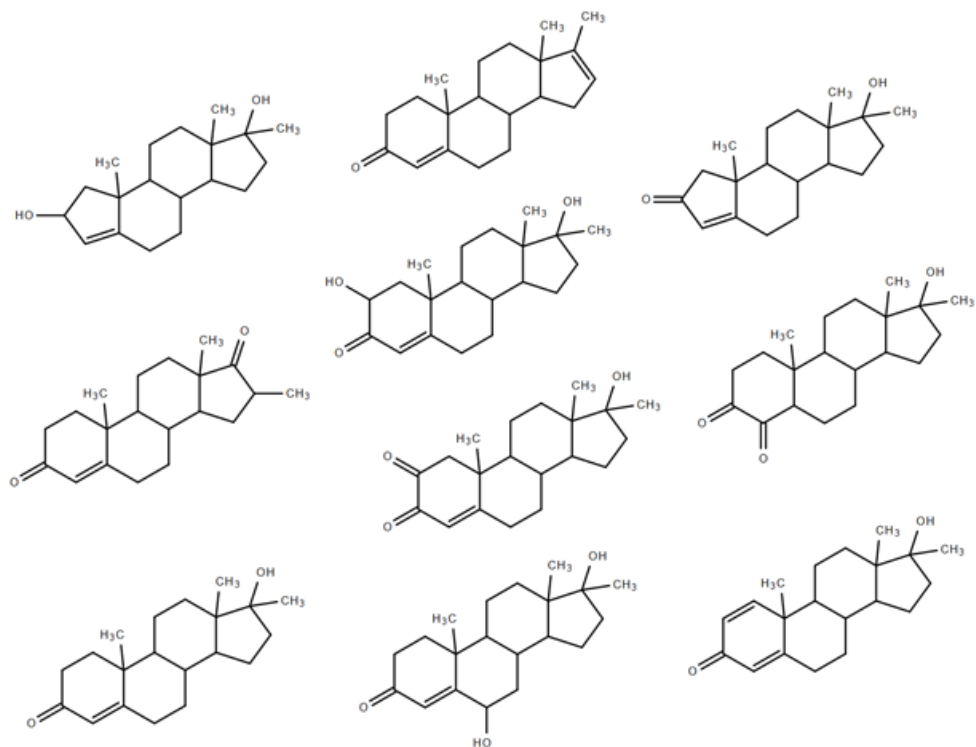
Posteriormente a isso, estudos presentes na literatura sugerem que as reações redox envolvendo o íon permanganato em meio alcalino formam um complexo intermediário entre o agente oxidante e o substrato. A Equação 6 apresenta a reação que envolve o ataque da espécie [MnO<sub>4</sub>.OH]<sup>2-</sup> sobre a 17α-metiltestosterona (MT), formando o complexo intermediário



Por fim, na Equação 7 é apresentada a oxidação do substrato envolvendo a transferência do elétron do íon permanganato para a MT. A clivagem do complexo leva a formação de um intermediário radical livre de 17α-metiltestosterona e a redução do íon permanganato. Este radical é rapidamente atacado por outra espécie [MnO<sub>4</sub>.OH]<sup>2-</sup> presente na solução gerando os produtos da degradação do analito.

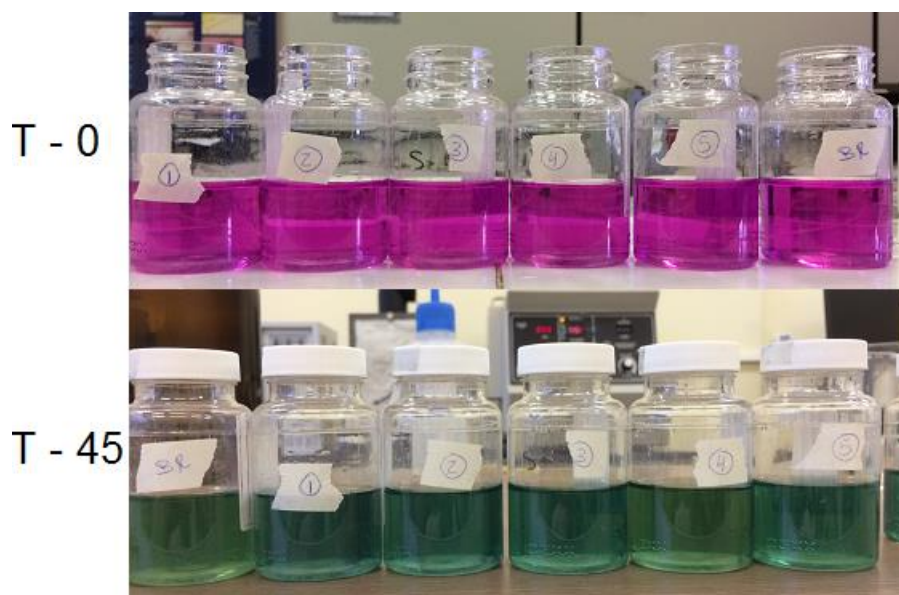


A partir desta etapa existem várias possibilidades de oxidação para a MT, descritas na literatura. Estudos realizados por Hu e col. (2012) trazem intermediários de degradação detectados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) apresentadas na FIG. 5.3.3, a partir de processos oxidativos avançados.



**Figura 5.3.3:** Intermediários de degradação de MT proveniente do estudo de processos oxidativos avançados, detectado por CG-EM (adaptado de Hu e col. (2012))

A solução contendo o íon  $\text{MnO}_4^-$  em meio alcalino apresenta coloração rosa e, quando reduzido, forma a espécie  $\text{MnO}_4^{2-}$  que apresenta cor azul esverdeada. A FIG. 5.3.4 apresentada fotografias do experimento utilizando solução de permanganato de potássio em meio alcalino na presença de  $17\alpha$ -metiltestosterona, obtidas no início do teste (tempo 0) e após 45 minutos após as adições das soluções de análises contendo MT. Como pode ser visto as cores das soluções corroboram com a literatura e confirmando as reações propostas demonstradas nas Equações 5 a 7.



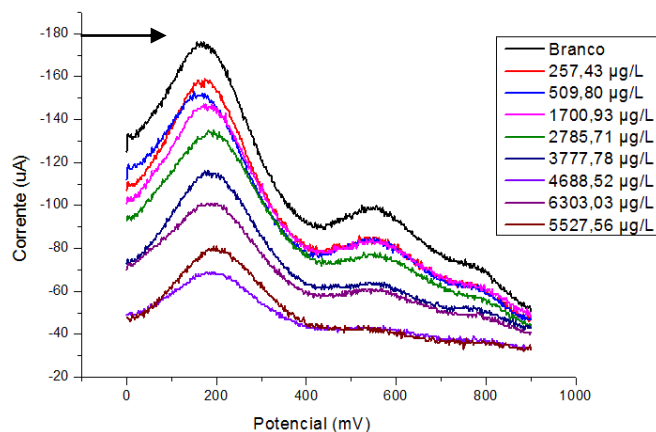
**Figura 5.3.4:** Fotografia no tempo 0 (T – 0) e após 45 minutos (T – 45) das adições das alíquotas das soluções de análise contendo MT.

Após testes de otimização por meio da voltametria de onda quadrada chegou-se aos parâmetros de faixa de potencial de varredura de 0,0 a 0,9 V, frequência de 50 Hz, 100 mV de degrau de potencial e 2 mV de incremento de potencial. Em seguida, alíquotas da solução padrão de MT preparada somente em água, foram avaliadas por meio de onda quadrada com os parâmetros citados e construiu-se o gráfico de concentração *versus* corrente de potencial. Na TAB. 5.3.2 são mostrados os volumes adicionados da solução padrão de MT, a concentração final na célula eletrolítica após as adições e a corrente gerada, no potencial de 176 mV.

**Tabela 5.3.2:** Informações de volume adicionado, concentração de MT e corrente da curva de adição de padrão da solução padrão de MT

Concentração de MT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
257	158
510	151
1701	147
2786	133
3778	115
4689	69
5528	79
6303	100

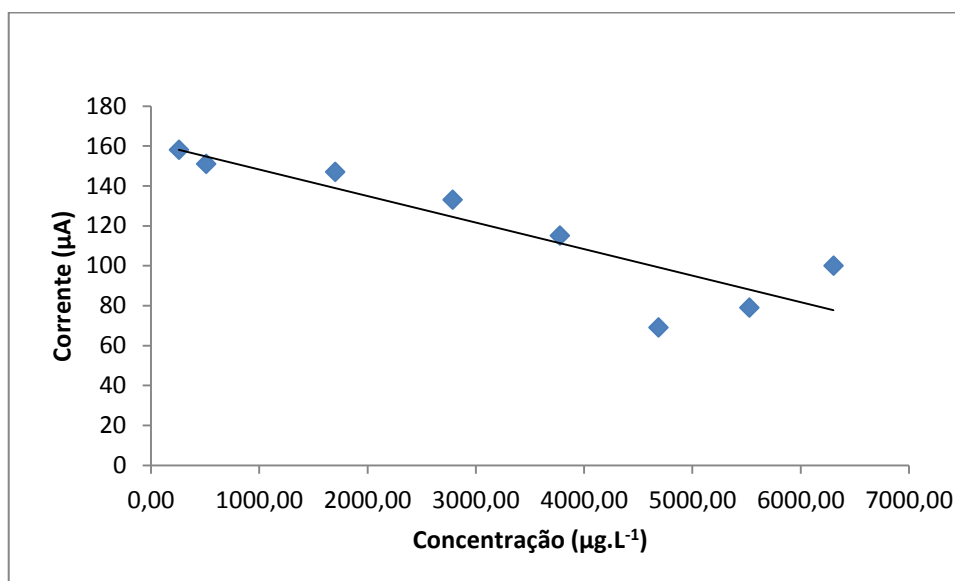
Na FIG. 5.3.5 é apresentado o voltamograma das adições de padrão da solução padrão de MT adquiridos com os parâmetros otimizados citados acima.



**Figura 5.3.5:** Voltamograma de voltametria de onda quadrada com potencial de varredura de 0,1 a 0,9 V, frequência de aquisição de 50 Hz, pulso de potencial de 100 mV e incremento de 2 mV da curva de adição de padrão da Solução Padrão de MT. A seta indica o sentido de varredura

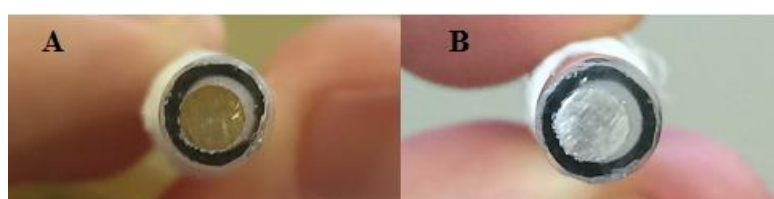
A região de potencial estudada foi em 176 mV no qual se observa a queda da intensidade de corrente ao longo das adições do padrão, com consumo da espécie na superfície do eletrodo. De acordo com as Equações de 5 a 7 demonstradas, o íon permanganato atua como um agente oxidante sendo consumido após sua redução, elucidando o decaimento da intensidade de corrente ao longo das adições da espécie a ser oxidada.

É possível verificar que na adição de padrão da leitura de 6303,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ , houve divergência na resposta de corrente contra a concentração adicionada. Na FIG. 5.3.6 é apresentada a curva de adição de padrão plotada com a concentração *versus* corrente de potencial na qual evidencia a divergência citada.



**Figura 5.3.6:** Curva da adição de padrão da solução padrão de MT, utilizando-se os valores de concentração e corrente de potencial apresentados na Tabela 5.3.2. ( $y = -0,0133x + 161,46$  e  $R^2 = 0,7932$ )

Observou-se que na superfície do eletrodo que há deposição de matéria na superfície do eletrodo auxiliar após sucessivas leituras (FIG 5.3.7). A partir destes resultados os testes seguintes foram realizados a limpeza de eletrodo de platina para evitar a adsorção de matéria.



**Figura 5.3.7:** Superfície do eletrodo auxiliar, eletrodo de platina, após as leituras da curva da adição de padrão da Solução Padrão de MT (A), com depósito de matéria, e antes das leituras (B)

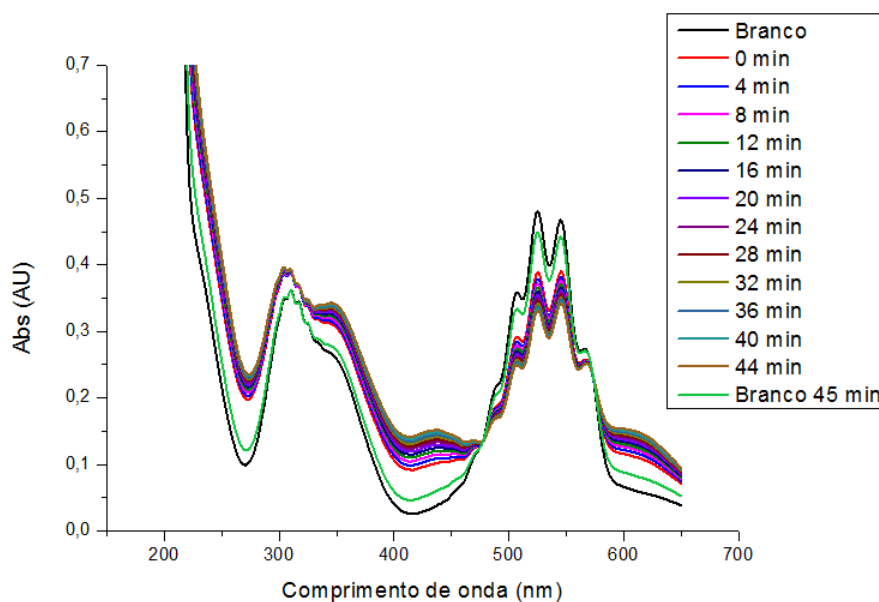
Nota-se que existe uma boa correlação entre as concentrações estudadas e a resposta de corrente. Adicionalmente foi realizado um teste estatístico de Grubbs (valor crítico para  $\alpha = 5\%$ ), com os valores da curva de adição de padrão (TAB 5.3.2), com o

objetivo de identificar a presença de *outlier*. Na TAB 5.3.3 é apresentado o resultado do teste estatístico demonstrando que a curva realizada não apresenta *outlier*.

**Tabela 5.3.3:** Teste Grubbs para identificação de outlier

Concentração de MT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )	G	Especificação
257	158	1,15	
510	151	0,95	
1701	147	0,83	
2786	133	0,41	<2,21
3778	115	0,12	
4689	69	1,48	
5528	79	1,18	
6303	100	0,56	

Com o auxílio do espectrofotômetro UV-Vis foi realizado o estudo do comportamento da solução com o tempo. Na FIG. 5.3.8 é apresentado o espectro de absorção de UV-Vis da solução branco e da solução contaminada com solução Padrão de MT.



**Figura 5.3.8:** Espectro de absorção da solução branco analisada no tempo zero e após 45 minutos e da solução contaminada com solução padrão de MT analisadas a cada 4 minutos.

A leitura da solução branco foi realizada no momento do preparo, isto é, no tempo zero e após 45 minutos, com diferença de 6,3% no máximo de absorção na região de 525 nm. Para a solução contaminada com solução padrão de MT fez-se a leitura no momento do preparo e em intervalos de 4 minutos até 44 minutos, e foi observada uma diferença entre os espectros iniciais e finais desta solução (13,1%).

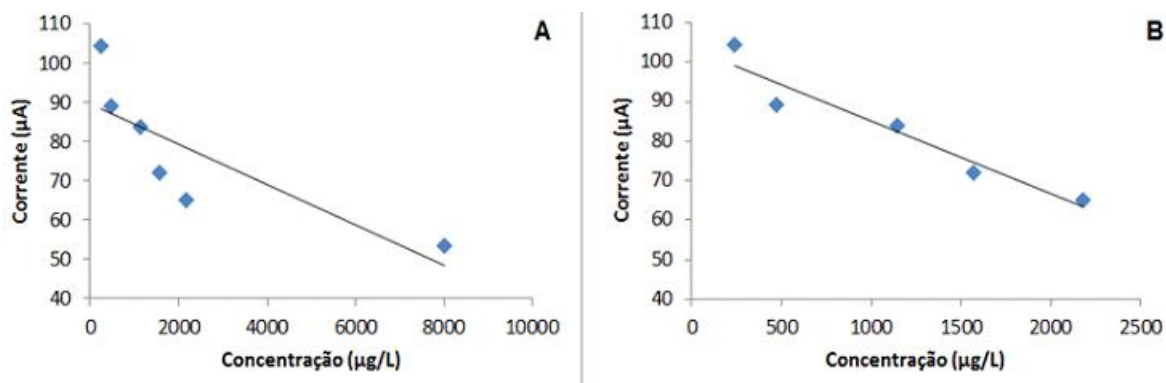
Os espectros de absorção são similares aos da literatura com as bandas de absorção na região de 525 nm características do permanganato, e nesta região é observada queda na banda de absorção indicando um consumo da espécie. O surgimento de bandas de absorção próximas as regiões de 350 e 435 são observadas nos espectros de absorção da solução contaminada com solução padrão de MT que provavelmente são procedidas das espécies de degradação da 17 $\alpha$ -metiltestosterona.

Adicionalmente foram realizadas medidas por voltametria de onda quadrada e espectrofotometria UV-Vis com as soluções apresentadas na TAB. 5.3.4, e também as respostas de cada técnica e concentração..

**Tabela 5.3.4:** Volume adicionado, concentração de MT e corrente obtida para a curva da solução padrão de MT

Solução	Volume adicionado ( $\mu\text{L}$ )	Concentração de MT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Corrente ( $\mu\text{A}$ )	Absorvância (AU)
1	100	237,62	104,28	0,953
2	200	470,59	89,10	0,927
3	500	1142,86	83,80	0,924
4	700	1570,09	72,15	0,916
5	1000	2181,82	65,14	0,864
6	5000	8000,00	53,41	0,520

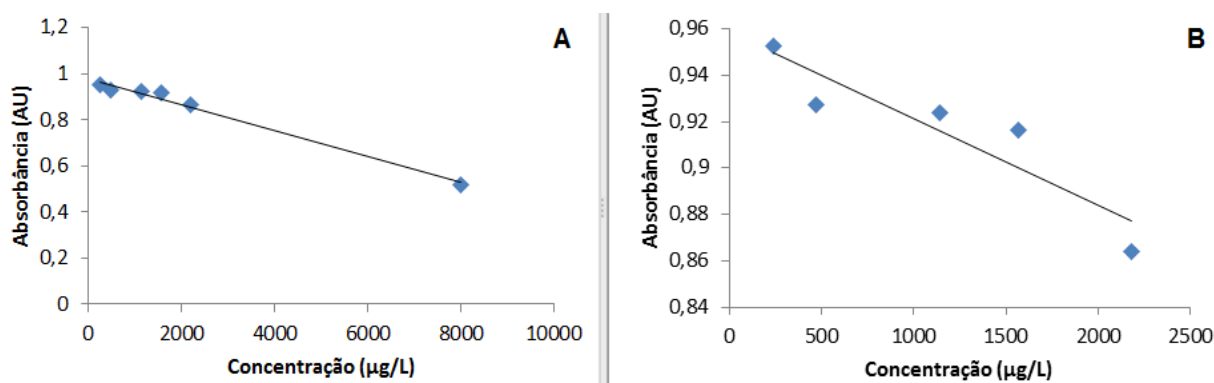
Na FIG. 5.3.9 é apresentada a curva de calibração das soluções por meio da voltametria de onda quadrada.



**Figura 5.3.9:** Curva da adição de padrão da solução padrão de MT, utilizando-se os valores de concentração e corrente de potencial apresentados na TAB. 5.3.3. Resultados da leitura realizada por voltametria de onda quadrada. A – todos as soluções ( $y = -0,0051x + 89,626$ ,  $R^2 = 0,6705$ ), B – retirada a solução 6 ( $y = -0,0184x + 103,51$ ,  $R^2 = 0,924$ ).

Como pode ser visto na FIG. 5.3.9 (A), apresenta-se o gráfico de concentração *versus* corrente de potencial de todas as soluções citadas, nota-se um valor muito baixo para o coeficiente de determinação. Na FIG B o mesmo gráfico foi realizado com a exclusão da solução 6 porque apresenta concentração muito alta quando comparado aos demais. A partir disto, foi observado que para concentrações elevadas do analito, há perda da linearidade, observado pelo valor do coeficiente de determinação de 0,6705 (gráfico A) para 0,924 (gráfico B). Neste estudo não foi realizada a linearidade do método e conseqüentemente não é de conhecimento a faixa analítica.

Na FIG. 5.3.10 é demonstrado a curva de calibração das soluções citadas por meio da espectrometria UV-Vis.





**Figura 5.3.10:** Curva da adição de padrão da solução padrão de MT, utilizando-se os valores de concentração e absorvância apresentados na TAB. 5.3.3. Resultados da leitura realizada por espectrofotometria Uv-Vis. A – todas as soluções ( $y = -6 \times 10^{-5}x + 0,9788$ ,  $R^2 = 0,9874$ ), B – retirado a solução 6 ( $y = -4 \times 10^{-5}x + 0,9585$ ,  $R^2 = 0,8317$ ) .

Na FIG. 5.3.10 (A) é apresentado o gráfico de concentração *versus* absorvância de todas as soluções citadas, para esta técnica o valor do coeficiente de determinação apresenta o valor de 0,9874, o que descreve que este modelo matemático para a concentração e absorvância apresenta uma boa correlação linear. Do mesmo modo, na FIG. 5.3.10 (B) o mesmo gráfico foi realizado com a exclusão da solução 6 e observou-se a diminuição no valor do coeficiente de determinação (0,8317), comportamento contrário quando se comparado a técnica de voltametria de onda quadrada, mas evidenciando a influência deste último ponto na análise da regressão alterando significativamente o coeficiente de determinação.

## 6 CONCLUSÃO

Independentemente das dificuldades citadas acima, até o presente momento pode-se prever que a determinação da 17  $\alpha$ -metiltestosterona por meio da formação do complexo com nitroprussiato e da oxidação por meio do permanganato de potássio podem ser realizada por métodos eletroquímicos com a utilização de eletrodos de grafite, sem a utilização de reagentes químicos como solventes orgânicos e mercúrio e com a utilização de um potenciostato com custo menor quando comparado aos equipamentos analíticos de cromatografia e análises *in situ*.

O método proposto precisa ser otimizado quanto a concentração, pH e composição da solução branco, a concentração utilizada de nitroprussiato de sódio, concentração de permanganato de potássio e parâmetros voltamétricos.

Não foi possível realizar a detecção da 17  $\alpha$ -metiltestosterona com a utilização do eletrodo de cobre recoberto com filme de bismuto por meio de técnicas voltamétricas.

## 7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

1. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html), acessada em Dezembro 2017
2. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, acessada em Dezembro 2017.
3. Pezzato, LE Situação atual da aquicultura na região sudeste. Aquicultura No Brasil: Bases Para Um Desenvolvimento Sustentavel: In: Valentin W. C; 2000.
4. El-Sayed, AF, Alternative dietary protein sources for farmed tilapia. *Oreochromis spp. Aquaculture*. 1999; 149.
5. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos> , acessada em Novembro 2017.
6. Budworth, PR, Senger PL; Fish-to-fish testosterone transfer in a recirculating-water system. *The Progressive Fish-Culturist*. 1993; 250.
7. <https://chemicalize.com/>, acessada em Novembro 2017.
8. Sandra Zago Falone, [Tese]. São Paulo:Universidade de São Paulo, departamento de Engenharia Ambiental; 2007.
9. Miranda, LG, Galli A, Quináia SP. Endocrine Interfering in Natural Waters: Voltammetric Determination of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Revista Virtual de Química*. 2014; 6:416.
10. Miranda LG; Felsnet ML, Torres YR Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. *Quim. Nova*. 2015; 38:419.
11. Oliveira RS, A. L.; Practical Electroanalysis: Overcoming drawbacks and going further. In: *Voltammetry theory, types and applications*. 2014; 171-198.
12. Wang J, *Analytical Electrochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. John Wiley e Sons, 2006
13. Pacheco WF, Semaan FS, Almeida VG, Ritta AG, Aucélio RQ, Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Revista Virtual de Química*. 2013; 516-537.
14. Wendt, Carla Letícia Gediél Rivero. Avaliação toxicológica do hormônio 17 Alfa metiltestosterona em espécies aquáticas. [Tese]. Brasília:Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina; 2013.

15. Bombardelli, RA; Hayashi, C; Meurer, F et al. Avaliação de rações fareladas e micropelletizadas para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) – desempenho e efetividade da reversão sexual. *Acta Sci. Anim. Sci.* 2004; 26:197
16. Santos KDS, Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. *Talanta.* 2010; 80:1999.
17. Josepg WPA; Adsorptive stripping voltammetry of sex hormones at the static Mercury drop electrode. *Analytica Chimico Acta.* 1985; 171:195.
18. M.M. Ghoneim, WB Voltammetric behavior and assay of the contraceptive drug levonorgestrel in bulk, tablets, and human serum at a mercury electrode. *Talanta.* 2004; 64:857.
19. <http://www.mercuryconvention.org/> acessada em Julho 2010.
20. <https://qualidadeonline.wordpress.com/2010/07/20/os-perigos-do-mercurio-para-o-homem/>, acessada em Julho 2010.
21. Zhiqiang WHW, Electrochemical determination of lead and cadmium in rice by adisposable bismuth/electrochemically reduced graphene/ionic liquidcomposite modified screen-printed electrode. *Sensors and Actuators.* 2014; 7-14.
22. Adams R. Carbon Paste Electrodes. *Analytical Chemistry.* 1958; 1576.
23. Tallman DE, Petersen SL. Composite Electrodes for Electroanalysis: Principles and Applications. *Electroanalysis.* 1990; 499-510.
24. Mendes RK, Claro-Neto S, Cavalheiro ET; Evaluation of a new rigid carbon–castor oil polyurethane composite as an electrode material. *Talanta.* 2002; 909-917.
25. Barsan MM, Pinto EM, Florescu M, Brett CM; Development and characterization of a new conducting carbon composite electrode. *Analytica Chimica Acta.* 2009; 71-78.
26. Brett CMA *et.al.*; Anodic stripping voltammetry of trace metals by batch injection analysis. *Analytica Chimica Acta.* 1996; 151-157.
27. Lovric M, Stripping Voltammetry. Greifswald: Fritz Scholz., *Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications.* 2009.
28. Giedre Grinciene AS, Peculiarities of Electrochemical Bismuth Film Formation in the Presence of Bromide and Heavy Metal Ions. *Electroanalysis.* 2009; 1743-1749.

29. Agnieszka Królicka, Andrzej Bobrowski, Jerzy Zarebski, and Iwona Tesarowic, Bismuth Film Electrodes for Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Sunset Yellow FCF in Soft Drinks. *Electroanalysis*. 2014; 26:756 – 765
30. Barbara Brunetti Recent Advances in Electroanalysis of Vitamins. *Electroanalysis*. 2016; 28:1 – 14
31. [http://qnint.s bq.org.br/qni/popup\\_visualizarMolecula.php?id=qL966oYcQH2pJ9Vb8wpzHsSA5Hf\\_GMZkYBb2f53QGyGwzZdjbk0a2IM-zeifjD22TnEsYyGI\\_Q1k9sh4Jovesw==](http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=qL966oYcQH2pJ9Vb8wpzHsSA5Hf_GMZkYBb2f53QGyGwzZdjbk0a2IM-zeifjD22TnEsYyGI_Q1k9sh4Jovesw==), acessada em Dezembro 2017.
32. <http://www.medicinanet.com.br/bula/3711/nipride.htm>, acessada em Dezembro 2017
33. <https://cardiopapers.com.br/guia-de-medicamentos-cardiovasculares-nitroprussiato-de-sodio/> , acessada em Dezembro 2017
34. <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0349/index.html>, acessada em Dezembro 2017.
35. Savaris, D. L. Desenvolvimento de método espectrofotométrico para determinação de 17alfametiltosterona. Trabalho de conclusão de curso. Bacharelado em Química. Unioeste, 2017
36. Hevari MM, Mohammadzadeh MA, Kinetics study of oxidation of medroxyprogesterone in presence alkaline potassium permanganate. *Asian Journal of Chemistry*, 2013; 25(6):3495-3496.
37. Cheng H. et al., Permanganate oxidation of diclofenac: The pH-dependent reaction kinetics and a ring-opening mechanism. *Chemosphere*, 2014.
38. Ahmed Fawzy, Sheikha SA, Mshael AMh, Base-catalyzed oxidation of l-asparagine by alkaline permanganate and the effect of alkali metal ion catalysts: a kinetic and mechanistic approach. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*. 2014; 111(2):443-460.
39. Ahmed Fawzy *et. al.*, Kinetics and Mechanistic Study of Permanganate Oxidation of Fluorenone Hydrazone in Alkaline Medium. Hindawi Publishing Corporation, 2016.
40. Dean Song *et., al.*, Enhanced Oxidation of Tetracycline by Permanganate via the Alkali-Induced Alteration of the Highest Occupied Molecular Orbital and the Electrostatic Potential. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2017; 56:4703–4708.

41. Ma WX, Liu YH e Sha, Spectrophotometric Determination of Centrophenoxine Hydrochloride with Alkalinity Potassium Permanganate Method. Asian Journal of Chemistry. 2011; 23(8):3481-3484.
42. Liu YH, Peng FY, Ma WX, Spectrophotometric Determination of Buflomedil Hydrochloride with Oxidation of Potassium Permanganate. Asian Journal of Chemistry. 2011; 23(10):4533-4535.
43. Saul Wolfe, Christopher F, Ingold, Oxidation of Olefins by Potassium Permanganate Mechanism of  $\alpha$ -Keto1 Formation. J. Am. Chem. SOC. 1981; 103:938-939
44. Xiao-bin Hu, Yue-hua Deng, Zhan-qi Gao, Ben-zhi Liu, Cheng Sun, Transformation and reduction of androgenic activity of  $17\alpha$ -methyltestosterone in  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNTs}-\text{H}_2\text{O}_2$  system. Applied Catalysis B: Environmental, 127, 2012, 167– 174.