

# ESCOLHA DAS CONDIÇÕES VOLTAMÉTRICAS, EMPREGANDO PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS, PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E ÁCIDO ÚRICO COM ELETRODO DE DDB

Reinaldo F. Teófilo<sup>1</sup>, Helder J. Ceragioli<sup>2</sup>, Alfredo C. Peterlevitz<sup>2</sup>, Vitor Baranauskas<sup>2</sup>, Márcia M.C. Ferreira<sup>1</sup>, Lauro T. Kubota<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil;

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Elétrica - Unicamp, Campinas - SP - Brasil

**RESUMO:** As condições voltamétricas usando voltametria de onda quadrada e eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação de dopamina e ácido úrico foram investigadas de maneira a obter uma condição favorável para a determinação destes dois compostos simultaneamente, visto que são interferentes mútuos. Uma triagem usando um planejamento fatorial fracionário foi utilizada para expor as principais variáveis que interferem no sistema. Uma metodologia de superfície de resposta empregando o planejamento Doehlert foi utilizada para definir os níveis satisfatórios das variáveis para a determinação simultânea dos dois compostos em tampão fosfato usando calibração multivariada.

**Palavras-Chaves:** Planejamentos experimentais, diamante dopado com boro, voltametria de onda quadrada.

## INTRODUÇÃO

A dopamina (DA) é um importante neurotransmissor no sistema nervoso central de mamíferos [1]. Em fluido extracelular do sistema nervoso central a concentração basal de DA é muito baixa i.e. 0,01–1,0  $\mu\text{M}$  [2]. Entre os principais problemas para sua determinação está a falta de resolução entre a DA, o ácido ascórbico (AA) e talvez, o ácido úrico (AU) e a alta concentração destes últimos em relação ao primeiro i.e. 100 – 500  $\mu\text{M}$  para AA e 1–50  $\mu\text{M}$  para AU. Em eletrodos sólidos tradicionais, AA e AU são oxidados em potenciais muito próximos ao da DA, resultando em uma sobreposição da resposta voltamétrica. Por outro lado, a determinação de ácido úrico é de extrema importância visto que níveis anormais de AU são sintomas de várias doenças [3]. Neste sentido, é essencial desenvolver métodos rápidos e simples para sua determinação em análises de rotina.

Vários métodos eletroanalíticos têm sido empregados para a determinação simultânea de DA e AU na presença de AA. A maioria se baseia na modificação da superfície do eletrodo de diferentes maneiras, e.g., usando polímeros [4], enzimas [5], ambientes micelares [6] ou por pré-tratamento eletroquímico [7]. Estas técnicas voltamétricas são mais seletivas, menos dispendiosas e consomem menos tempo que aquelas baseadas nos métodos espectrofotométricos. Entretanto, mesmo quando boa seletividade e sensibilidade são alcançadas com estas modificações, há freqüentes complicações relacionadas com os fenômenos de adsorção [4] ou a necessidade de renovação da superfície após cada medida [7]. No presente trabalho, nós descrevemos um estudo das condições voltamétricas usando planejamentos experimentais para a determinação simultânea e seletiva de DA e AU usando voltametria de onda quadrada (VOQ) no eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB). O objetivo do estudo foi alcançar os melhores níveis das variáveis para se obter as melhores respostas, e assim, um baixo limite de quantificação tanto para a DA quanto para o AU, visando uma determinação simultânea destes dois analitos na presença de AA.

O uso de EDDB tem crescido significativamente nos últimos anos. Isto se deve às suas características únicas tais como: baixa e estável corrente de fundo, ampla janela de potencial em meio aquoso, inércia química (pobre adsorção de moléculas orgânicas), relativa insensibilidade para o oxigênio presente na solução e extrema estabilidade da resposta por longo período de tempo [8].

Os planejamentos experimentais tanto para triagem quanto para metodologia de superfície de resposta (MSR) são extremamente úteis para se obter o máximo de informação do sistema químico estudado de uma maneira inteligente empregando poucos experimentos [9].

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

**Crescimento dos filmes de diamante:** Filmes de diamante dopado com boro policristalino foram produzidos em um reator de deposição de vapor químico (CVD) com um filamento quente em um cilindro de quartzo. A fonte de boro foi dissolvida em etanol. Fios de tungstênio foram usados como substrato. Os filmes de diamante foram depositados empregando uma mistura de vapor de etanol diluído em gás hidrogênio (99.5% vol) a uma taxa de fluxo volumétrica de 100  $\text{cm}^3/\text{min}$  (sccm). A pressão foi mantida a 20 torr [8]. Os eletrodos foram isolados usando fita de teflon e resina epóxi e então inseridos dentro do tubo de polipropileno, expondo apenas uma área do eletrodo para os estudos eletroanalíticos.

**Medidas eletroquímicas:** As medidas eletroquímicas foram executadas em uma célula com três eletrodos: um eletrodo de calomelano saturado (ECS) foi usado como eletrodo de referência e uma espiral de platina foi usada como contra eletrodo. Todas as medidas foram realizadas em um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 30 gerenciado pelo software GPES 4.9 a partir de um micro computador.

**Condições voltamétricas:** As condições voltamétricas foram definidas usando planejamentos experimentais para buscar as condições satisfatórias. Os estudos foram realizados para o AU e DA separadamente. A concentração para ambos os compostos foi fixada em 100  $\mu\text{M}$  na célula. A resposta usada neste estudo foi definida de acordo com a seguinte equação:  $r = (i_p / I_p \cdot \sqrt{v}) \cdot 10^6$ , onde  $i_p$  é a corrente de pico em ampere (A),  $I_p$  é a largura do pico a meia altura e  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{Vs}^{-1}$ ). Os valores foram normalizados por um fator de  $10^6$ . A divisão pela largura do pico foi adicionada na equação com o objetivo de se obter picos menos largos. A divisão pela raiz quadrada da velocidade de varredura é necessária visto que a corrente de pico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Porém, nem sempre um aumento na corrente devido a altas velocidades de varredura significa um aumento na sensibilidade. A divisão por este fator retira a influência da velocidade de varredura durante o estudo.

**Tratamento dos dados:** A linha de base de todos os voltamogramas foi corrigida usando a janela de média móvel com largura de pico de 0.019 para DA e de 0.009 para AU. Todos os cálculos relativos aos planejamentos experimentais foram realizados usando planilhas eletrônicas [9].

**Reagentes e soluções:** Os reagentes dopamina (Aldrich), ácido úrico (Aldrich) e fosfato de sódio (Synth) foram usados como recebido e todas as soluções foram preparadas em água Milli-Q ( $>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um planejamento fracionário  $2^{4-1}$  com ponto central foi elaborado para investigar as variáveis que apresentam influência significativa sobre o sistema estudado. As variáveis estudadas foram: concentração do tampão fosfato de sódio ([TP]), pH do tampão, amplitude (Ampl.) e frequência (Freq.) da onda quadrada. A faixa de varredura foi de 0,01 a 1,05 V e o incremento de potencial foi fixado em 0,02  $\text{V s}^{-1}$ . A Tabela 1 apresenta as variáveis e níveis estudados.

**Tabela 1:** Variáveis e seus respectivos níveis investigados.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
[TP] ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0,05	0,075	0,1
pH	5,8	6,5	7,2
Ampl. (V)	0,05	0,075	0,1
Freq. (Hz)	50	75	100

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que as variáveis apresentam maiores influências sobre o AU que sobre a DA. O pH não foi significativo para a DA, porém foi o mais significativo para o AU. A Tabela 2 indica que as variáveis Ampl. e Freq. necessitam de um estudo mais detalhado visto que elas foram de grande importância para os dois compostos. O efeito da variável [TP] indica para maiores concentrações, enquanto que o efeito do pH indica para um valor mais baixo do pH para o AU. Estas duas variáveis foram fixadas em 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  e 6,0 respectivamente.

**Tabela 2:** Efeitos principais para cada composto e seus respectivos p valor calculados a partir do erro puro.

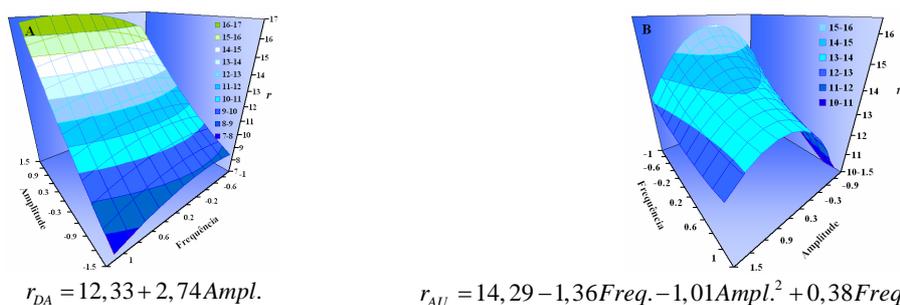
	Efeito		p	
	DA	AU	DA	AU
Média	5,69*	7,25*	0,00E+00	0,00E+00
[TP]	0,59*	1,55*	2,86E-04	1,36E-04
pH	-0,01	-1,59*	9,09E-01	1,17E-04
Ampl	2,57*	1,43*	0,00E+00	1,96E-04
Freq	-0,82*	-1,50*	5,90E-05	1,56E-04

\*efeitos significativos a um nível de significância de 0.05 e 4 graus de liberdade pelo teste t.

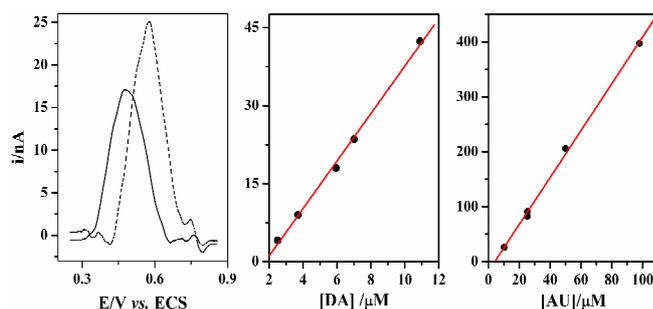
Um planejamento Doehlert para MSR foi elaborado para as variáveis amplitude e frequência. Os níveis para variável amplitude foram em volts: 0,05; 0,0625; 0,075; 0,0875 e 0,1; enquanto que os níveis para a variável frequência foram em Hz: 8; 16,5 e 25. Os níveis estão na ordem indicada pelo planejamento Doehlert.

Os modelos para a DA e para o AU foram construídos usando regressão linear múltipla e validados através da análise de variância (ANOVA). As regressões foram significativas e não houve falta de ajuste para ambos os modelos. Os coeficientes de correlação foram de 0,973 para a DA e de 0,985 para o AU. Observe pelas equações apresentadas na Figura 1 que para a DA apenas a amplitude foi significativa enquanto que para o AU apenas o coeficiente principal para a amplitude não foi significativo. Buscando um compromisso para as condições ótimas para ambos os analitos, pode-se concluir que os níveis satisfatórios das variáveis amplitude e frequência foram 0,075 V e 16,5 Hz, respectivamente. Estes valores foram obtidos decodificando os níveis 0,2 e 0,3 para frequência e amplitude, respectivamente, indicados na figura 1.

Nas condições satisfatórias encontradas, os limites de detecção e de quantificação foram respectivamente para a DA de 2,92 e 9,70  $\mu\text{M}$  e para o AU de 3,94 e 13,10  $\mu\text{M}$ .



**Figura 1:** Superfície de resposta para os modelos quadráticos construídos para a DA (A) e para o AU (B) com suas respectivas equações contendo os coeficientes significativos com um nível de significância de 0,05 e 4 graus de liberdade pelo teste t. Os valores para amplitude e freqüência estão codificados nos gráficos conforme planejamento Dohelert (não apresentado).



**Figura 2:** Resultados obtidos utilizando as condições satisfatórias. **A:** Voltamogramas para a DA (—) e para o AU (---) nas concentrações de 6 µM e 10 µM, respectivamente; **B:** Curva analítica para a DA; **C:** Curva analítica para o AU.

Conforme apresentado na Figura 2 a resposta voltamétrica ficou bem definida e uma ampla linearidade foi obtida para ambos compostos, apesar de uma faixa mais extensa não ter sido investigada.

## CONCLUSÕES

Apesar de o limite de quantificação para a DA não ter atingido níveis desejados, o EDDB mostrou-se promissor na análise tanto da DA quanto do AU, visto que uma baixa adsorção foi observada e removida facilmente durante a análise.

**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem às agências CNPq e FAPES.

## REFERÊNCIAS

- [1] WIGHTMAN R.M., AMATORE C., ENGSTROM R.C., HALE P.D., KRISTENSEN E.W., “Real-time characterization of dopamine overflow and uptake in the rat striatum” *Neuroscience* 25(2): 513-523 1988.
- [2] DOWNARD A.J, RODDICK A.D., BOND A.K.M., “Covalent modification of carbon electrodes for voltammetric differentiation of dopamine and ascorbic acid” *Anal. Chim. Acta* 317(1-3): 303-310 1995.
- [3] ESWARA DUTT V.V.S., MOTTOLA H.A., “Determination of uric acid at the microgram level by a kinetic procedure based on a pseudo-induction period” *Anal. Chem.* 46(12): 1777-1781 1974.
- [4] ZEN J.M.; CHEN P.J. *Anal. Chem.*, “A Selective Voltammetric Method for Uric Acid and Dopamine Detection Using Clay-Modified Electrodes” 69(24): 5087-5093 1997.
- [5] GILMARTIN M.A.T., HART J.P., “Voltammetric and amperometric behavior of uric-acid at bare and surface-modified screen-printed electrodes - studies towards a disposable uric-acid sensor” *Analyst*, 117(8): 1299-1303 1992.
- [6] DOS REIS A.P., TARLEY C.R.T., MANIASSO N., KUBOTA L.T., “Exploiting micellar environment for simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid and dopamine” *Talanta*, 67(4): 829-835 2005.
- [7] CAI XH., KALCHER K., NEUHOLD C., OGOROVIC B., “An improved voltammetric method for the determination of trace amounts of uric-acid with electrochemically pretreated carbon-paste electrodes” *Talanta*, 41(3): 407-413 1994.
- [10] TEÓFILO R.F., CERAGIOLI H.J., PETERLEVITZ A.C., DA SILVA L.M., DAMOS F.S., FERREIRA M.M.C., BARANAUSKAS V., KUBOTA L.T. “Electrochemical behaviour of boron-doped polycrystalline diamond electrodes deposited on tungsten wires using ethanol”, *Diamond Relat Mater* 2006, no prelo.
- [9] TEÓFILO R.F., FERREIRA M.M.C., “Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial”, *Quim. Nova* 29(2): 338-350, 2006.

**e-mails para contato:** teofilo@iqm.unicamp.br, vitor@dsif.fee.unicamp.br, kubota@iqm.unicamp.br