

QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE DOPAMINA, ÁCIDO ÚRICO E ÁCIDO ASCÓRBICO COM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO USANDO VOLTAMETRIA E PLS

Reinaldo F. Teófilo¹, Helder J. Ceragioli², Alfredo C. Peterlevitz², Vitor Baranauskas², Márcia M.C. Ferreira¹, Lauro T. Kubota¹.

¹ Instituto de Química - Unicamp, Campinas - SP - Brasil;

² Departamento de Engenharia Elétrica - Unicamp, Campinas - SP - Brasil

RESUMO: Eletrodo de diamante dopado com boro foi usado para a quantificação simultânea de dopamina, ácido úrico e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada e quadrados mínimos parciais. Mesmo a altas concentrações de ácido úrico e ácido ascórbico foi possível quantificar a dopamina. Os erros relativos médios foram de 10,96; 6,20 e 9,72% e os limites de quantificação foram de 7,48; 14,71 e 19,97 μM para dopamina, ácido úrico e ácido ascórbico, respectivamente.

Palavras-Chaves: Quimiometria, PLS, diamante dopado com boro, voltametria de onda quadrada.

INTRODUÇÃO

Dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) são compostos de grande interesse biomédico, que executam funções essenciais no metabolismo dos mamíferos. A dopamina é atualmente objeto de intensa pesquisa nas áreas de neurociência e química e é, portanto, essencial o desenvolvimento de um método rápido e simples para sua quantificação [1]. Similarmente, o AA (vitamina C) é um componente vital na dieta humana e tem sido usado para a prevenção e tratamento de resfriados, indisposições mentais, infertilidade, câncer e AIDS [2]. O ácido úrico (AU) é o primeiro produto final do metabolismo da purina. Sabe-se que níveis anormais de AU são sintomas de várias doenças [3], dentre elas o infarto. As concentrações de AA e AU em fluidos biológicos podem atingir altos valores i.e. 100-500 μM e 1-50 μM respectivamente, enquanto que as concentrações de DA apresentam baixas concentrações com um nível basal de 0,01 – 1 μM .

Do ponto de vista eletroanalítico, a oxidação de DA, AA e AU está próxima de um mesmo potencial, o que resulta em sobreposição da resposta voltamétrica fazendo com que a discriminação de cada composto seja extremamente difícil [4]. Vários trabalhos na literatura apresentam diferentes tipos de modificações de eletrodos que tem o objetivo de determinar DA, AA e AU simultaneamente [1,4]. 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 [5] ou a necessidade de renovação da superfície após cada medida [6].

Neste sentido, é essencial desenvolver métodos rápidos, simples, sensíveis, seletivos e estáveis para a determinação simultânea de DA, AA e AU em análises de rotina [1].

No presente trabalho é apresentado um método eletroquímico simples e seletivo para a determinação simultânea de DA, AU e AA usando voltametria de onda quadrada (VOQ), eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) e ferramentas quimiométricas, tais quadrados mínimos parciais (PLS) para construir o modelo de calibração multivariada e sinal analítico líquido (NAS) para os cálculos das figuras de mérito.

O uso de EDDB tem crescido significativamente nos últimos anos. Isto se deve às suas características únicas tais como: corrente de fundo baixa e estável, 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 [7].

As ferramentas quimiométricas são aquelas que empregam métodos matemáticos e estatísticos sofisticados para extrair o máximo de informação do sistema químico de uma maneira inteligente e são extremamente úteis em química analítica quando problemas de sobreposições de sinais são observados [8].

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. Detalhes sobre as características destes filmes são apresentados na referência [7].

Medidas eletroquímicas: As medidas eletroquímicas foram executadas em uma célula com três eletrodos: um eletrodo de calomelano saturado (SCE) 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 em estudo prévio e são as seguintes: tampão fosfato 0,1 M pH 6, incremento de potencial 0,02 V, amplitude 0,075 V, frequência 16,5 Hz e faixa de varredura de 0,01 a 1,2 V.

Reagentes e soluções: Os reagentes dopamina (Aldrich), L(+)-ácido ascórbico (Sigma) e ácido úrico (Aldrich), foram usados como recebidos. Todas as soluções foram preparadas em água Milli-Q (>18 MΩ.cm).

Um planejamento fatorial parcial foi elaborado para obter as variáveis dependentes. Os valores médios, mínimos e máximos para as concentrações, em μM, foram respectivamente de 29,8; 14,6 e 45,7 para a DA; 251,7; 45,8 e 458,0 para o AU; 218,6; 42,2; 403,0 para o AA.

Tratamento dos dados: Os conjuntos de calibração e externo para previsão foram compostos de 22 e 16 amostras, respectivamente. Todas as variáveis independentes (525) ou seleções destas variáveis para cada analito foram utilizadas. A linha de base de todos os voltamogramas foi corrigida usando uma janela de média móvel com largura de 0.015. Modelos PLS foram construídos para todas as variáveis dependentes simultaneamente (PLS2) e individualmente (PLS1). O número de variáveis latentes foi determinado através do cálculo do erro médio quadrático da validação cruzada (RMSECV). A habilidade de previsão do modelo foi avaliada pelo erro médio quadrático de previsão para amostras com concentrações desconhecidas (RMSEP). As figuras de mérito tais como: seletividade, sensibilidade e limite de quantificação, foram calculadas utilizando o cálculo do NAS [9]. Todos os cálculos foram realizados em ambiente Matlab.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de DA foi estudada em níveis bem abaixo daquelas para AU e AA, conforme é mostrado na figura 1A. A figura 1B apresenta os voltamogramas para os analitos estudados e para a mistura dos três, observe a alta sobreposição dos três picos. Os voltamogramas para as misturas do conjunto de calibração são apresentados na figura 1C.

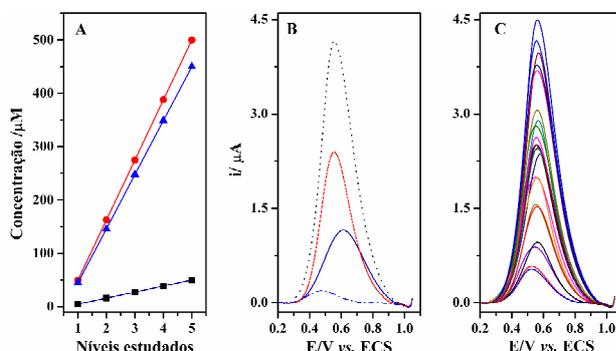


Figura 1: [A] faixa de concentração investigada para DA(■), AU(●) e AA(▲). [B] Voltamogramas com correção de linha base para a DA(---), AU(---), AA(—) e mistura(....); [C] Voltamogramas das misturas do conjunto de calibração.

Três diferentes modelos foram construídos i.e. PLS2, que constrói um modelo com todas as variáveis dependentes simultaneamente calculando um vetor de regressão para cada analito a partir dos mesmos valores de scores e loadings; PLS1c e PLS1s que são os modelos construídos para cada variável dependente utilizando ou todas as variáveis independentes (c) ou variáveis independentes selecionadas (s). A seleção de variáveis foi realizada utilizando o algoritmo baseado na seleção das variáveis ordenadas (OPS) [10].

Os resultados para os modelos construídos são mostrados na tabela 1. Observe que os maiores erros (RMSECV e RMSEP) foram obtidos para o modelo PLS2 e que os menores foram obtidos para o modelo PLS1s para ambos os analitos. Além disto, os coeficientes de correlação obtidos entre os valores medidos e preditos ou pela validação cruzada (r_{cv}) ou pelo conjunto predição (r_p) foram maiores para o modelo PLS1s. Portanto o modelo PLS1s mostrou ser o de maior capacidade de predição, o que indica a necessidade de se realizar uma seleção de variáveis em modelos de calibração multivariada com dados voltamétricos.

Tabela 1: Diferentes modelos PLS construídos para a quantificação simultânea de DA, AU e AA

	DA			AU			AA		
	PLS2	PLS1c	PLS1s	PLS2	PLS1c	PLS1s	PLS2	PLS1c	PLS1s
Fatores	4	8	8	4	5	5	4	6	6
rmsecv	6,33	3,24	2,24	39,48	30,47	22,89	37,33	30,14	22,12
r_{cv}	0,88	0,96	0,98	0,96	0,97	0,99	0,96	0,97	0,98
rmsep	4,44	3,43	3,62	23,73	20,44	11,39	22,15	19,97	18,49
r_p	0,91	0,95	0,95	0,98	0,99	0,99	0,97	0,98	0,98

Número de variáveis independentes: PLS2: 525; PLS1c: 525; PLS1s: 225 (DA), 111(AU) e 90(AA).

As concentrações medidas *versus* as preditas pelo modelo PLS1s são mostradas na figura 2. Para o conjunto externo de predição os valores mínimo, máximo e médio para os erros relativos foram respectivamente de 0,45%; 37,62%; 10,96% para a DA, 0,001%; 53,14% e 6,20% para o AU e de 1,46%; 44,82% e 9,72% para o AA. Para a DA quatro amostras apresentaram erros acima de 18% e as restantes ficaram abaixo de 12%. Os modelos apresentaram excelentes predições para o AU e para o AA. Para os dois analitos apenas uma amostra apresentou um alto erro relativo.

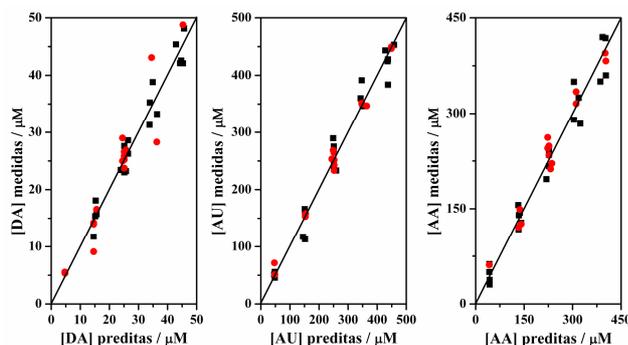


Figura 2: Concentrações medidas *versus* previstas para a validação cruzada (■) e para o conjunto externo de predição (●).

As figuras de mérito para calibração multivariada foram calculadas segundo Booksh e Kowalski, 1994 [9] e são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Figuras de méritos calculadas para o modelo PLS1s.

	DA	AU	AA
Seletividade	0,014	0,045	0,025
Sensibilidade/ $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	0,0013	0,0063	0,0024
LOQ (μM)	2,13	4,20	5,70

Os resultados da tabela 1 indicam o quanto as seletividades dos analitos são baixas, confirmando a grande interferência entre os analitos. A sensibilidade analítica estabelece a menor diferença de concentração entre amostras, a qual pode ser distinguida pelo método de calibração. A sensibilidade foi claramente maior para o AU.

CONCLUSÕES

A determinação simultânea de DA, AU e AA no EDDB foi possível usando VOQ e PLS. O EDDB mostrou ser fundamental devido à alta adsorção destes compostos em eletrodos sólidos convencionais. Entre os modelos PLS construídos, aquele que utilizou variáveis independentes selecionadas mostrou ser significativamente melhor. Finalmente, o modelo foi validado através das figuras de mérito.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem às agências CNPq e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- [1] ZARE H.R., RAJABZADEH N., NASIRIZADEH N., ARDAKANI M.M., "Voltammetric studies of an oracet blue modified glassy carbon electrode and its application for the simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid" *J. Electroanal. Chem.* 589(1): 60–69 2006.
- [2] ARRIGONI O., De TULLIO M.C., "Ascorbic acid: more than just an antioxidant", *Biochim. Biophys. Acta* 1569 (1-3): 1–9 2002
- [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] ZARE H.R., NASIRIZADEH N., MAZLOUM-ARDAKANI M., "Electrochemical properties of a tetrabromo-p-benzoquinone modified carbon paste electrode. Application to the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid", *J. Electroanal. Chem.* 577(1): 25-33 2005.
- [5] ZEN J.M.; CHEN P.J., "A Selective Voltammetric Method for Uric Acid and Dopamine Detection Using Clay-Modified Electrodes" *Anal. Chem.* 69(24): 5087-5093 1997
- [6] CAI XH., KALCHER K., NEUHOLD C., OGOREVC 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.
- [7] 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.
- [8] NAES T., ISAKSSON T., FEARN T., DAVIES T., *Multivariate calibration and classification*, Chichester: UK, Nir publications, pp. 27-69, 2002.
- [9] Booksh K.S., Kowalski B.R., "Theory of analytical chemistry", *Anal. Chem.* 66(15) 782A-791A 1994.
- [10] Teófilo R.F., Martins J.P.A., Ferreira M.M.C., "Ordered predictors Selection: na intuitive method to find the most relevant variables in multivariate regression", Proc. 10th International Conference on Analytical Chemistry, Águas de Lindóia, Brasil, P066, 2006.

e-mail dos autores: teofilo@iqm.unicamp.br, vitor@dsif.fee.unicamp.br, kubota@iqm.unicamp.br