

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ (UFJ)
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CISAU)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
SAÚDE (PPGCAS)**

MARIA LUIZA LOPES SIERRA E SILVA

**Desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificados
com nanopartículas de óxido de silício e ouro como biossensores
para detecção de 17- β -estradiol**

**JATAÍ
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS EXATAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFJ

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Jataí (UFJ) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFJ), regulamentada pela Resolução CEPEC no 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data. O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFJ é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor:

MARIA LUIZA LOPES SIERRA E SILVA

3. Título do trabalho:

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE SILÍCIO E OURO COMO BIOCENSORES PARA DETECÇÃO DE 17-BETA-ESTRADIOL

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;

- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Moraes Arantes, Professora do Magistério Superior**, em 20/09/2021, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIA LUIZA LOPES SIERRA E SILVA, Discente**, em 20/09/2021, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **2358208** e o código CRC **C07CE84B**.

MARIA LUIZA LOPES SIERRA E SILVA

**Desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificados
com nanopartículas de óxido de silício e ouro como biossensores
para detecção de 17- β -estradiol**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde (CISAU) Universidade Federal de Jataí (UFJ) para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde. Área de Concentração: Novos Materiais e Metodologias Aplicadas à Saúde. Linha de Pesquisa: Nanotecnologia, Biomateriais e Materiais Compatíveis

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Moraes Arantes;

Coorientador: Prof. Dr. Gildiberto Mendonça de Oliveira

JATAÍ
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFJ.

Silva, Maria Luiza Lopes Sierra
DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE SILÍCIO E OURO COMO BIOCENSORES PARA DETECÇÃO DE 17- β -ESTRADIOL / Maria Luiza Lopes Sierra Silva. - 2021. 73, XVI f.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Moraes Arantes; co-orientador Prof. Dr. Gildiberto Mendonça de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Jataí, Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Jataí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde, Jataí, 2021.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biossensores. 2. Nanopartículas. 3. Disruptores Endócrinos. 4. Eletroanalítica. I. Arantes, Tatiane Moraes, orient. II. Título.

CDU 543



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO - REGIONAL JATAÍ

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **37** da sessão de Defesa de Dissertação de MARIA LUIZA LOPES SIERRA E SILVA, que confere o título de Mestra em Ciências Aplicadas à Saúde, na área de concentração em Novos Materiais e Metodologias Aplicadas à Saúde.

No vigésimo quinto dia do mês de agosto de dois mil e vinte e um, a partir das 14h00 horas, realizou-se a sessão pública integralmente por meio de tecnologias de comunicação à distância de Defesa de Dissertação intitulada “DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS POR NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE SILÍCIO E OURO PARA A APLICAÇÃO EM BIOCENSORES PARA DETECÇÃO DE 17-BETA-ESTRADIOL”. Os trabalhos foram instalados pelo Coorientador, Professor Doutor Gildiberto Mendonça de Oliveira (CIEXA / UFJ) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Paulo de Tarso Garcia (UNIFESSPA), membro titular externo; Professora Doutora Liliane Nebo (CIEXA / UFJ), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, sendo a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Gildiberto Mendonça de Oliveira, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, no vigésimo quinto dia do mês de agosto de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE SILÍCIO E OURO COMO BIOCENSORES PARA DETECÇÃO DE 17-BETA-ESTRADIOL



Documento assinado eletronicamente por **Gildiberto Mendonça De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Liliane Nebo, Professor do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo de Tarso Garcia, Usuário Externo**, em 25/08/2021, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2265462** e o código CRC **B02C8009**.

Referência: Processo nº 23070.040909/2021-13

SEI nº 2265462

Os Programas de Pós-Graduação *stricto sensu*, ora em funcionamento na Universidade Federal de Jataí (UFJ), em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, continuam provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás (UFG), no entanto, todos os elementos pré-textuais do trabalho apresentado estão identificados como Universidade Federal de Jataí, em função da migração da BDTD ter ocorrido a partir de 16 de agosto de 2021, e pelo fato das pesquisas e produções estarem sendo realizadas na UFJ

*Dedico este trabalho aos meus pais e as minhas irmãs Ana
Maria (In Memoriam †) e Maria Cecília.*

“Você já se sentiu como um pássaro? [...]

Voar não é tão fácil e nem tão bonito como parece. Voar é se esforçar para as asas baterem, para ter ritmo, para ter equilíbrio. Voar é desejar não cair. Voar é esperar o momento certo de pousar, de respirar; mas será que há? [...]

A tal da liberdade é estranha quando pensamos assim... porque na verdade, no fundo, bem lá no íntimo, talvez você só queira uma gaiola para caber e um lugar para pertencer. Você quer ser mais do que as fotografias, do que o encaixe na natureza ou a esperança em meio a tempestade. Você quer estar dia após dia: na tristeza, na alegria, no que é bom e também no que não é tão assim. Contudo e só por isso, talvez o medo de ser pássaro te impeça de pousar e os outros que estão acostumados a pousar tenham medo de confiar em quem não consegue parar.

Mas talvez, só talvez... Você já se sentiu como um pássaro?”

Ana Maria Lopes Sierra e Silva[†]

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo;

À minha orientadora Professora Dr^a. Tatiane Moraes Arantes, pela confiança e o acolhimento, tanto no âmbito pessoal quanto no laboratorial. Obrigada por todos os conselhos e também pelos puxões de orelha com amor e carinho, os quais me fizeram crescer imensamente como humana e como pesquisadora, obrigada por estar ao meu lado nesse trajeto tão importante da minha vida, obrigada por toda a paciência e por toda a ajuda;

Ao Professor Dr. Gildiberto Mendonça de Oliveira pela coorientação, pela confiança, pela dedicação e pela ajuda em todas as fases por mim vividas dentro do laboratório, por todos os ensinamentos a mim transmitidos e pela paciência e preocupação, o meu sincero obrigada por estar ao meu lado nessa caminhada;

À toda a minha família, em especial aos meus pais Áureo e Cristina, pois sem eles eu nada seria ou almejaría e por não medirem esforços para me ajudar a traçar a minha jornada. A Maria Cecília pelo apoio e também pelas brigas/risadas compartilhadas. A Ana Maria[†] (In Memoriam), por me ensinar a ser pássaro e voar, mas mesmo assim pertencer a algo, a um lugar, obrigada pela sua jornada ao meu lado;

Aos meus amigos de curso e da vida, em especial, Arthur, Natália, Maria Antônia, Andressa e Danielle por terem estado comigo durante todos esses anos e me entenderem em todas as fases, sendo elas boas ou ruins, muito obrigada a vocês por estarem comigo em todos os momentos, e por continuarem ao meu lado, obrigada por terem sido suporte, por serem a família que Deus me designou;

A todos os professores do curso de química e da Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos ao longo da minha vida acadêmica e pessoal;

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Goiás, em especial a secretária Kelly Cristina, por toda a ajuda e a amizade.

RESUMO

Desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificados com nanopartículas de óxido de silício e ouro como biossensores para detecção de 17- β -estradiol

Este trabalho teve como objetivo a síntese de nanopartículas de ouro (NpAu) e de óxido de silício (NpSiO₂) para confecção de eletrodos modificados de pasta de carbono (EPC) para detecção eletroanalítica de 17- β -estradiol. Buscando-se então a obtenção de dispositivos com alta sensibilidade, seletividade e especificidade, visando melhorar os níveis de limite de detecção e limite de quantificação (LD e LQ), estabelecidos dentro da regulamentação pela Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) e pelo Ministério da Saúde, das técnicas tradicionais, como a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa. Neste trabalho foram preparados os eletrodos modificados de pasta de carbono com a inserção de NpAu e NpSiO₂ para detecção eletroanalítica do Valerato de Estradiol (VE), derivado sintético homólogo a função do 17- β -estradiol. A detecção eletroanalítica foi dada em soluções eletrolíticas contendo ou não o surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Os resultados apresentados demonstram que estes eletrodos podem ser utilizados para a construção de biossensores para este hormônio sem que haja a necessidade da incorporação de marcadores de difícil acesso e ou processos com maior custo agregado para a obtenção da superfície sensora. Pôde-se observar que a inserção das Np na pasta de carbono melhorou significativamente os parâmetros analíticos de limite de detecção. Para os eletrodos de pasta de carbono na solução sem SDS: sem modificação, NpAu e NpSiO₂, 0,397 μ mol/L; 0,179 μ mol/L e 1,30 μ mol/L, respectivamente. Para o limite de quantificação dos eletrodos na solução sem SDS: sem modificação, NpAu e NpSiO₂, de 1,20 μ mol/L; 0,542 μ mol/L e 3,95 μ mol/L, respectivamente. Para os EPCs na solução contendo SDS 1,00 mmol/L: sem modificação, para os eletrodos modificados com as NpAu e NpSiO₂, 0,0975 μ mol/L; 0,299 μ mol/L e 0,0186 μ mol/L, respectivamente. Para o limite de quantificação dos eletrodos para os eletrodos de pasta de carbono: sem modificação, NpAu e NpSiO₂, 0,297 μ mol/L; 0,905 μ mol/L, 0,0563 μ mol/L, respectivamente. A adição do surfactante SDS na solução eletrolítica amplificou o sinal analítico da corrente relativa à oxidação do VE possibilitando assim a melhoria do sinal ruído e a detecção de quantidades menores do analito nas amostras. Dentre os eletrodos testados para o método desenvolvido no presente trabalho, é importante salientar que os melhores resultados foram obtidos quando se tratava do EPC modificado com as NpSiO₂, onde o LD e LQ para este eletrodo, tanto na solução com SDS quanto na solução sem SDS foram dados dentro do limite estabelecido para a regulamentação pela ANA e pelo Ministério da Saúde.

ABSTRACT**Development of carbon paste electrodes modified with silicon oxide and gold nanoparticles as biosensors for detection of 17- β -estradiol**

The objective of this work was the synthesis of gold (NpAu) and silicon oxide (NpSiO₂) nanoparticles for the manufacture of modified carbon paste (EPC) electrodes for the electroanalytical detection of 17- β -estradiol. Seeking then to obtain devices with high sensitivity, selectivity, and specificity, aiming to improve the detection limit and quantification limit levels (LD and LQ), established within the regulations by the National Water and Basic Sanitation Agency (ANA) and by the Ministry of Health, of traditional techniques, such as liquid chromatography and gas chromatography. In this work, modified carbon paste electrodes with the insertion of NpAu and NpSiO₂ were prepared for electroanalytical detection of Estradiol Valerate (VE), a synthetic derivative homologous to the function of 17- β -estradiol. Electroanalytical detection was performed in electrolyte solutions containing or not the anionic surfactant Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). The results presented demonstrate that these electrodes can be used to build biosensors for this hormone without the need to incorporate markers that are difficult to access and/or processes with a higher added cost to obtain the sensor surface. It could be observed that the insertion of Np in the carbon paste significantly improved the analytical detection limit parameters. For carbon paste electrodes in the solution without SDS: without modification, NpAu, and NpSiO₂, 0.397 $\mu\text{mol/L}$; 0.179 $\mu\text{mol/L}$ and 1.30 $\mu\text{mol/L}$, respectively. For the limit of quantification of the electrodes in the solution without SDS: without modification, NpAu and NpSiO₂, of 1.20 $\mu\text{mol/L}$; 0.542 $\mu\text{mol/L}$ and 3.95 $\mu\text{mol/L}$, respectively. For EPCs in the solution containing 1.00 mmol/L SDS: no modification, for electrodes modified with NpAu and NpSiO₂, 0.0975 $\mu\text{mol/L}$; 0.299 $\mu\text{mol/L}$ and 0.0186 $\mu\text{mol/L}$, respectively. For the limit of quantification of electrodes for carbon paste electrodes: without modification, NpAu, and NpSiO₂, 0.297 $\mu\text{mol/L}$; 0.905 $\mu\text{mol/L}$, 0.0563 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The addition of SDS surfactant in the electrolyte solution amplified the analytical signal of the current relative to the LV oxidation, thus enabling the improvement of the noise signal and the detection of smaller amounts of analyte in the samples. Among the electrodes tested for the method developed in this work, it is important to emphasize that the best results were obtained when it was the EPC modified with NpSiO₂, where the LD and LQ for this electrode, both in the solution with SDS and in the solution without SDS were given within the limit established for regulation by the ANA and the Ministry of Health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica da fase de nucleação e crescimento para nanopartículas coloidais.....	3
Figura 2. Representação da (a) imposição de potencial na VC; (b) voltamograma cíclico obtido	9
Figura 3. Representação da (a) imposição de potencial na Voltametria de Pulso Diferencial; (b) voltamograma de pulso diferencial obtido.	10
Figura 4. Representação da interface eletrodo/solução	11
Figura 5. Representação dos processos que ocorrem na camada de difusão.....	11
Figura 6. Estrutura básica dos hormônios esteroides.	15
Figura 7. Fórmula estrutural do (a) 17- β -estradiol e (b) Valerato de Estradiol.....	15
Figura 8. Valores encontrados na literatura para os limites de exposição do 17- β -estradiol	17
Figura 9. Níveis de Excreção diária por indivíduos saudáveis.....	17
Figura 10. Representação da Oxidação do Valerato de estradiol.....	18
Figura 11. Representação da célula eletroquímica contendo 3 eletrodos: (a) eletrodo de referência; (b) eletrodo de trabalho (EPC); (c) contra eletrodo; (d) solução eletrolítica	25
Figura 12. Espectro de Uv-Vis de Valerato de Estradiol na solução de Metanol.	27
Figura 13. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier para a amostra de VE.....	28
Figura 14. Esquema representativo da formação de Nps Coloidais de Ouro.....	30
Figura 15. Espectro de UV-Vis de Nanopartículas de Ouro em diferentes tempos de síntese.	30
Figura 16. (a) MET e (b) Distribuição do tamanho de partícula para as NpSiO ₂	31
Figura 17. Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier para a amostra de NpSiO ₂	32
Figura 18. Espectro de EDS para amostra de pó com NpAu (a) distribuição dos átomos de carbono e de ouro na amostra; (b) imageamento EDS para pó contendo nanopartículas de ouro; (c) distribuição de átomos de ouro na superfície da amostra (d) distribuição de átomos de carbono na superfície da amostra	33
Figura 19. MEV para (a) Pó de grafite modificador; (b) pó de grafite com NpAu.....	34
Figura 20. Espectro Raman para amostras de pó de grafite contendo (—) Grafite puro; (—) Nanopartículas de Ouro.....	35
Figura 21. VC em 50 mV/s com janela de potencial entre +0,000 a +1,200 V, velocidade de varredura de 50 mV/s, a voltametria deu-se em 1 ciclo (Ag/AgCl, KCl 1 mol/L) para a solução eletrolítica com (—) e sem (—) Valerato de Estradiol para os eletrodos de (a)sem modificador, (b) NpAu, (c) NpSiO ₂	36

Figura 22. DPV janela de potencial entre +0,000 a +1,200 V, com amplitude de pulso de 50 mV e passo de potencial de 5 mV e velocidade de varredura em 10 mV/s (Ag/AgCl, KCl 1 mol/L) para os eletrodos (—) sem modificador, (—) NpSiO ₂ , (—) NpAu	37
Figura 23. Voltamogramas cíclicos em PBS (pH 7,0) (—) branco; (—) 17-β-estradiol; (—) SDS/Valerato de Estradiol para (a) eletrodo sem modificação; (b) NpAu; (c) NpSiO ₂	38
Figura 24. Voltamogramas DPV (—) PBS/17-β-estradiol; (—) SDS/17□□□estradiol; (a) eletrodo sem modificação; (b) NpAu; (c) NpSiO ₂	40
Figura 25. Curva de Calibração para o SDS I/nA vs. [SDS]/ mol/L.	41
Figura 26. Curva de Calibração sem SDS para os eletrodos (a) Sem modificação; (b) NpSiO ₂ ; (c) NpAu.	44
Figura 27. Curva de Calibração para os eletrodos (a) Sem modificação; (b) NpSiO ₂ ; (c) NpAu	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das Variáveis utilizadas para a confecção do planejamento fatorial.	23
Tabela 2. Configuração do planejamento fatorial 2^{5-2} (-1) menor nível e (+1) maior nível.....	24
Tabela 3. Valores de Efeito sobre Sinal/Ruído do planejamento fatorial 2^{5-2}	42
Tabela 4 Valores de LD e LQ para o Valerato de Estradiol na solução sem SDS	44
Tabela 5 Valores de LD e LQ para o Valerato de Estradiol na solução com SDS 1,00 mmol/L.....	45
Tabela 6. Trabalhos utilizando eletrodos modificados para determinação de estrogênios e seus respectivos LD.	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- a – Coeficiente angular da reta
- A – Ampère
- Au – Ouro
- β – Beta
- μ – micro
- DPV – Voltametria de Pulso Diferencial
- EPC – Eletrodo de Pasta de Carbono
- EDS – espectroscopia de raios-X por dispersão de energia
- FT-IR – Infravermelho com Transformada de Fourier
- HSF – Hormônios Sexuais Femininos
- LD – Limite de Detecção
- LQ – Limite de Quantificação
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- m – Mili
- nm – nanômetro
- Nps – Nanopartículas
- NpAu – Nanopartículas de Ouro
- NpSiO₂ – Nanopartículas de Óxido de Silício
- PBS – Tampão Fosfato
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- SiO₂ – Dióxido de Silício
- S/R – Sinal / Ruído
- s.d. – desvio padrão
- TEOS – Tetraetilortosilicato
- U.S. – Urina Sintética
- Uv-Vis – Ultravioleta-Visível
- VE – Valerato de estradiol
- V – Volt
- VC – Voltametria Cíclica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. NANOMATERIAIS _____	1
1.1.1. ORIGEM DOS NANOMATERIAS E METODOS DE OBTENÇÃO _____	1
1.1.2. NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE ÓXIDO DE SILÍCIO _____	5
1.2. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS E ELETRODO DE PASTA DE CARBONO (EPC) _____	6
1.3. BIOSSENSOR _____	12
1.4. DESREGULADORES ENDÓCRINOS – 17-β-ESTRADIOL _____	14
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL _____	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	20
4. PARTE EXPERIMENTAL	21
4.1. REAGENTES _____	21
4.2. SOLUÇÃO ESTOQUE DE VALERATO DE ESTRADIOL (VE) _____	21
4.3. SOLUÇÃO DE TAMPÃO FOSFATO _____	21
4.4. SOLUÇÃO DE URINA SINTÉTICA (U.S.) _____	21
4.5. SOLUÇÃO DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) _____	22
4.6. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (NPAU) _____	22
4.7. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE SILÍCIO (NPSiO ₂) _____	22
4.8. PREPARO DOS ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO _____	22
4.9. PLANEJAMENTO FATORIAL _____	23
4.10. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DOS MATERIAIS _____	24
4.11. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS DE TRABALHO _____	25
4.12. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO VALERATO DE ESTRADIOL _____	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES _____	27
5.1. CARACTERIZAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS MATERIAIS _____	27
5.2. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS DE TRABALHO _____	35
5.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O VALERATO DE ESTRADIOL _____	42
6. CONCLUSÃO _____	47

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
--------------------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanomateriais

1.1.1. Origem dos Nanomateriais e Métodos de Obtenção

Os nanomateriais compõem um campo científico em ascensão que lida com o desenvolvimento de novos métodos para preparação de partículas muito pequenas, dadas na ordem de 10^{-9} m (nm), podendo ser polímero, metal ou material semicondutor. A definição presente no Sistema Internacional de Unidade (SI), adotada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 1988) define que os limites de tamanho para a utilização do prefixo nano compreendem o intervalo de medidas dado entre $10^{-12} < \text{nm} < 10^{-6}$ m (Almeida et al., 2021; Gorup et al., 2011). Os materiais em escala nanométrica exibem propriedades físicas e químicas distintas ao se comparar com as características dos materiais na escala macroscópica, conhecidos pela denominação de bulk (Gorup et al., 2011; Herbst et al., 2004).

Estes novos materiais despontaram na ciência, por volta terceira década do século XX, mas apenas começaram a ser objetivo de interesse e investigação e a sua posterior e manipulação pelo ser humano a partir do século XXI. Dentre estes novos materiais encontrados na escala nanométrica destacam-se as nanopartículas (Nps). As ciências que são dedicadas ao estudo dos nanomateriais são a Nanotecnologia e a Nanociência, e o princípio básico destas é a elaboração de estruturas e de novos materiais a partir dos átomos em seu estado fundamental. A nanociência é considerada atualmente como uma das áreas mais promissoras da ciência, e mostra resultados com grande notabilidade. Os materiais quando apresentados na escala nanométrica podem apresentar diferentes propriedades físicas, químicas e/ou biológicas, o que amplia o leque de possibilidades para a aplicação destes em diversas áreas (Almeida et al., 2021; Cancino et al., 2014; Martins & Trindade, 2012)

Os nanomateriais podem ter origem de fontes naturais, como a magnetita biogênica e a proteína ferritina ou de fontes não naturais (Almeida et al., 2021; Marcone, 2015; Paschoalino et al., 2010). Nps de fontes não naturais são resultantes da manipulação do homem, provenientes dos processos industriais ou de atividades que envolvam a queima de combustíveis fósseis, tendo como produto uma grande quantidade de materiais particulados. É crucial estremar entre dois tipos de materiais resultantes da intervenção humana: nanomateriais manipulados quimicamente: onde há a manufatura destes para a incorporação em materiais, em especial Nps metálicas e nanomateriais não manipulados, que são oriundos predominantemente da queima dos combustíveis fósseis (Almeida et al., 2021; Marcone, 2015; Paschoalino et al., 2010). A

produção de nanomateriais manufaturados pode ser classificada em dois principais ramos, onde os mesmos podem ser produzidos por métodos físicos ou métodos químicos (Gorup et al., 2011).

Os métodos físicos, denominados como métodos “*top-down*”, na tradução literal de cima para baixo, dedicam-se à fabricação das estruturas em nanoescala. Partindo de estruturas de maior tamanho por meio de processos físicos, onde os materiais são quebrados até se obter partículas muito pequenas. Têm-se como um exemplo deste processo a sonólise (Araujo et al., 2016) e a nanolitografia (Cavalleri et al., 2019), no entanto, estas possuem uma baixa homogeneidade granulométrica na escala nanométrica. Os métodos químicos, denominados como “*bottom-up*”, são os processos em que o nanomaterial é sintetizado a partir da montagem da substância átomo por átomo, e, portanto, tem uma maior facilidade de obtenção e do controle de tamanho do material a ser obtido. Geralmente, os métodos bottom-up são preferíveis aos métodos top-down por possibilitarem o maior controle sobre o processo da síntese do material de interesse, sendo possível o controle do tamanho do nanomaterial, possibilitando a maior aplicabilidade desses produtos em processos industriais e/ou para pesquisas no campo científico (Arantes et al., 2012; Feldman, 2014; Gorup et al., 2011).

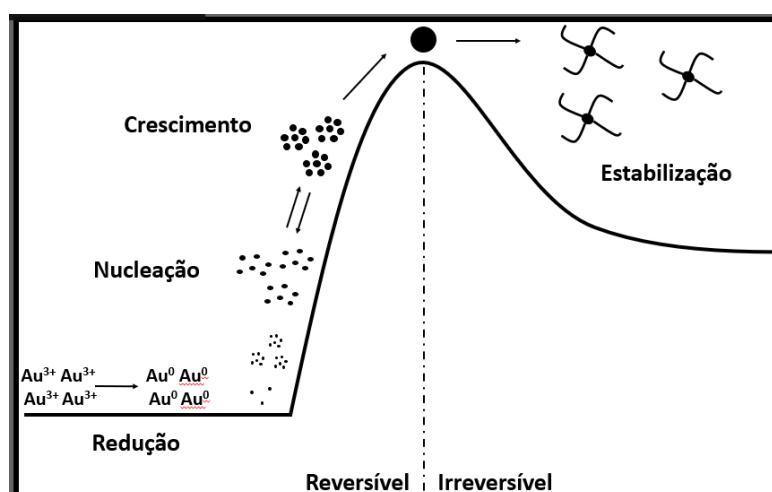
Para os métodos “*bottom-up*”, na tradução literal de baixo para cima, podem existir fases principais na síntese de Nps, sendo elas divididas entre a fase de nucleação e a fase de crescimento. Na fase da nucleação ocorre a formação de pequenos núcleos metálicos ou não metálicos, a partir do precursor, quando a concentração destas se encontra acima de um limiar de nucleação. Na fase de crescimento ocorre a deposição de átomos livres nos núcleos formados durante a fase de nucleação, dando início assim o seu crescimento (Arantes et al., 2012; Araujo et al., 2016; Feldman, 2014; Gorup et al., 2011; Pereira, 2014).

A variação dos tamanhos das Nps depende da duração relativa entre estas fases de nucleação e crescimento. O controle do tamanho e da morfologia das Nps é obtido através da modulação dos processos de nucleação e crescimento, com o controle do tempo em que as mesmas ficam em síntese. Uma das maneiras de conseguir este controle sobre o processo é coordenar a quantidade de átomos de precursor disponíveis e/ou introduzir moléculas com afinidade para a superfície da partícula em formação, com o objetivo de reduzir o crescimento da partícula (Araújo et al., 2016; Feldman, 2014; Gorup et al., 2011).

A Figura 1 representa um esquema gráfico da síntese de Nps coloidais de Ouro (Au), mostrando a fase de nucleação e crescimento, que pode também ser atribuído de forma geral a outros tipos de Nps metálicas coloidais. A teoria LaMer (Alvarez et al., 2018; Gorup et al.,

2011) explica como ocorre o mecanismo de nucleação e de crescimento na formação de Nps quando se trata da síntese química. Este mecanismo é dividido em quatro etapas (redução, nucleação, crescimento e estabilização). Na etapa da redução: os íons Au^{3+} são reduzidos a átomos de Au^0 , aumentando a concentração deste até que haja a sua saturação. A fase da nucleação ocorre pelas colisões entre os átomos Au^0 que irão formar ou *clusters*, ou numa tradução literal os núcleos. A fase de crescimento das Nps depende das ligações dos átomos de ouro à superfície dos núcleos anteriormente formados, onde este processo pode ser dado de forma reversível. Na fase de estabilização, o tamanho final da partícula é dado quando há o consumo de todo o reagente precursor e quando as Nps atingem o tamanho que seja termodinamicamente estável. A presença de estabilizantes, como os íons citrato ou a adição de bases moderadamente fortes ao meio reacional, faz-se necessário para que haja o controle do crescimento das Nps. A formação das Nps monodispersas, sendo elas metálicas ou não metálicas, é favorecida pela fase de nucleação rápida, ou seja, quando há a formação simultânea dos núcleos antes de seu crescimento. Quando os processos de nucleação e de crescimento ocorrem ao mesmo tempo as Nps são dadas de modo polidisperso, ou seja, apresentam tamanhos e forma diferentes (Alvarez et al., 2018; Gorup et al., 2011). Em geral, quando o crescimento é uniforme o tamanho de partícula do núcleo é favorecido para formar Nps esféricas, no entanto, o crescimento anisotrópico dos núcleos, dado em diferentes direções, favorece outras formas.

Figura 1. Representação gráfica da fase de nucleação e crescimento para nanopartículas coloidais.



Adaptada de Alvarez et al., 2018

As Nps são classificadas como um corpo que tem uma dimensão da ordem de 100 nm ou menor. Estas apresentam propriedades únicas devido ao fato de possuírem dimensão na

ordem nanométrica. As nanopartículas se apresentam com uma elevada área superficial em relação ao seu volume, sendo assim há um maior número de átomos na superfície e na camada adjacente à superfície do material de interesse. Devido a razão área/volume, os efeitos da superfície têm uma grande importância para as características destes materiais (Alvarez et al., 2018; Arantes et al., 2012; Feldman, 2014; Gorup et al., 2011).

Pode haver mudanças das suas propriedades mecânicas, como o módulo e a resistência do material onde as Np serão agregadas; elétricas, como o aumento da condutividade do composto a ser estudado; ópticas como a refração ou reflexão da luz incidida; e também a mudança nas propriedades magnéticas, que as diferenciam de seu material de origem, e estas propriedades são dependentes do tamanho e da forma das partículas. Alguns materiais magnéticos, quando na escala nanométrica, podem não apresentar a imantação característica quando apresentadas na ordem de 10 nm. Outro exemplo de mudança de comportamento é o apresentado pelas Nps de óxido de silício (NpSiO_2), estas apesar de incolores, ao assumirem arranjos cristalinos empacotados podem difratar a luz visível tornam o material de interesse colorido (Almeida et al., 2021; Alvarez et al., 2018). Um mesmo material pode apresentar propriedades físicas e químicas diferenciadas apenas com a modificação de suas características, como o seu tamanho, a sua auto-organização, a sua estrutura cristalina e a sua forma (Pereira, 2014).

Alguns métodos de obtenção pela síntese química de nanomateriais particulados utilizados para a realização deste trabalho foram o método de Stöber (Arantes et al., 2012; Stöber et al., 1968) e o método de Turkevich, proposto por Gorup et al. (Gorup et al., 2011; Turkevich et al., 1951). Estes apresentam diferentes rotas *bottom-up* para a obtenção de Nps de diferentes substâncias, levando em consideração o precursor, onde um é um óxido e o outro um íon metálico, que sofreram a posterior redução ou oxidação.

A obtenção de nanomateriais particulados, por métodos químicos, mais usual é o da síntese coloidal, que gera de maneira controlada, partículas em diversas conformações, podendo ser estas cilíndricas, esféricas, em bastonetes, entre outras formas (Ahmadi et al., 2009; Murray et al., 2001; Yin & Alivisatos, 2005). Diversas rotas de obtenção de Nps por meio de precursores em solução foram descritas ao longo dos últimos anos, dadas estas características as Nps obtidas permanecem dispersas na solução original. As rotas utilizadas para o presente trabalho, foram a de síntese pela redução do Citrato (Gorup et al., 2011; Horisberger & Rosset, 1977; Saha et al., 2012) e a síntese de Stöber proposta por Arantes et al., dependendo do

precursor de interesse (Arantes et al., 2012; Gorup et al., 2011; Jin et al., 2003; Stöber et al., 1968).

Dentre os numerosos métodos químicos aplicados na obtenção de Nps metálicas, tais como: ouro, prata e platina; o mais comumente usado é conhecido como Método de Citrato ou Turkevich. O método de Turkevich é baseado em uma reação de oxidação-redução em solução aquosa entre o íon citrato e o íon do sal metálico de interesse, sendo o apresentado para o desenvolvimento deste trabalho as Nanopartículas de Ouro coloidais (NpAu). A síntese das NpAu pelo método do citrato mostra vantagens sobre outras rotas da redução química para Nps metálicas, pois este apresenta um procedimento de fácil manejo e, de alta reprodutibilidade. É comprovado que este método tem como produto NpAu com boa homogeneidade e com tamanhos em média de 20 nm, podendo se estender a uma escala maior ao se alterar as condições aplicadas para a síntese das mesmas, sendo este comprovado pela absorção UV-Vis da Banda Plasmon dos aglomerados das NpAu (Alvarez et al., 2018; Gorup et al., 2011; Jin et al., 2003; Pereira, 2014).

O método de síntese de Stöber foi o primeiro a ser descrito para obtenção de sílica monodispersa, este consiste na hidrólise do tetraetilortosilicato (TEOS), tendo a amônia como catalisador do processo (Stöber et al., 1968). Como em todas as pesquisas científicas, anos depois da publicação deste método proposto, modificações quanto as variáveis envolvidas para a síntese foram estudadas. O método utilizado para a obtenção de Nanopartículas de dióxido de silício (NpSiO₂), estudado por Arantes (Arantes et al., 2012) que investigou a influência das concentrações de TEOS, amônia e água em meio alcoólico, através de um planejamento fatorial 2³, o que permitiu avaliar o tamanho das NpSiO₂ após a mudança dos parâmetros de síntese, onde poderiam ser obtidas nanopartículas esféricas de SiO₂ numa faixa entre 13 a 133 nm de tamanho (Arantes et al., 2012).

1.1.2. Nanopartículas de Ouro e de Óxido de Silício

O Ouro (Au), elemento pertencente ao sexto período dos metais de transição, e por apresentar uma baixa reatividade em escala macroscópica é considerado como um metal inerte em condições normais de temperatura e pressão. A sua forma cristalina mais estável apresentada é dada pela estrutura cúbica de face centrada, o que proporciona a este elemento químico algumas características singulares como uma grande condutividade térmica e elétrica, alta maleabilidade e ductilidade (Ahmadi et al., 2009).

Devido a essas características, o ouro tem tido uma elevada utilização na área da nanotecnologia. As nanopartículas de Ouro (NpAu), tem ganhado uma maior visibilidade nos últimos anos devido as suas propriedades óticas, elétricas e catalíticas. As aplicações das NpAu têm se expandido gradativamente graças à geração de novos dispositivos ópticos e eletrônicos, bem como possibilitando a manufatura de dispositivos com habilidade para detecção e/ou reconhecimento de biomoléculas de interesse da clínica médica, como é o caso dos hormônios estrogênicos (Ahmadi et al., 2009; Alvarez et al., 2018; Atta et al., 2011; Gholivand & Parvin, 2011; Pereira, 2014). Uma das importantes características dessas Nps é a sua elevada área superficial em relação ao seu volume, o que lhe confere propriedade única, especialmente em relação a reatividade da mesma, diferenciada da encontrada em sua escala macroscópica. O ouro quando na forma nanoparticulada passa a reagir com outros elementos, possibilitando a formação de nanocompósitos (Murray et al., 2001).

O Silício (Si) é um dos elementos que existe em maior abundância na crosta terrestre, pertencente ao terceiro período da tabela periódica. tem como sua estrutura cristalina mais estável é semelhante a estrutura cristalina do diamante, coordenada como cúbica de face centrada com 4 átomos a mais no centro da estrutura, o que compete ao silício uma propriedade semicondutora. Em condições ordinárias, o Silício só é encontrado na forma combinada com outros elementos, dentre eles Alumínio, Magnésio, Oxigênio, entre outros. Quando este é encontrado na forma da combinação com o Oxigênio forma o composto denominado óxido de Silício, sendo este utilizado para diversas aplicações no âmbito tecnológico. Este material apresenta diferentes conformações de dopagem, alterando com sucesso as suas características de condução elétrica. Devido as suas características apresentadas na forma macroscópica, o óxido de Silício é muito visado para a aplicação tecnológica, seja devido a sua capacidade semicondutora, ou a sua capacidade de formação de Nps coloidais estáveis. A formação de nanocompósitos de SiO₂ é de grande interesse para a nanotecnologia, uma vez que por ter propriedades diferentes em ambas as escalas e, alguns processos podem ser miniaturizados, gerando uma melhor capacidade de condução elétrica, devido a interessante propriedade da área superficial/volume de nanomateriais particulados (Arantes et al., 2012; Camargo, 2011).

1.2. Técnicas eletroanalíticas e Eletrodo de Pasta de Carbono (EPC)

As técnicas eletroanalíticas relacionam as medidas de quantidades elétricas, como, corrente, potencial e carga, com alguns parâmetros químicos como a concentração (Vaz et al., 1996). Estas técnicas apresentam diversas vantagens, sendo a principal delas a possibilidade da

análise direta da amostra, sem a necessidade de etapa de separação ou pré-tratamento da mesma. A aplicação de métodos eletroanalíticos possibilita a análise em materiais coloridos ou com partículas sólidas dispersas (Bard et al., 2003; Nossol, 2009; Pacheco et al., 2013; Satpati & Bard, 2012).

As técnicas eletroanalíticas são preferíveis quando se trata da análise de amostras complexas, tais como amostras biológicas e/ou ambientais, pois raramente requerem etapas de pré-tratamento de amostras (Nossol, 2009; Pacheco et al., 2013; Satpati & Bard, 2012). As respostas obtidas com a utilização de técnicas eletroanalíticas tendem a sofrer pouca, ou quase nenhuma, influência de interferentes presentes nas amostras (Montes, 2015; Satpati & Bard, 2012). A eletroanalítica colabora de forma positiva em pesquisas científicas nas diferentes áreas de conhecimento da química, em especial na bioquímica de compostos sintéticos similares aqueles secretados pelo corpo humano. O uso das técnicas voltamétricas para a detecção de hormônios como o estradiol (Cincotto & Machado, 2017; Janegitz et al., 2014), a estrona (Moreira & Spinelli, 2019; Santos & Spinelli, 2013a), o estriol (Cesarino et al., 2015; Cincotto & Machado, 2017; Gomes et al., 2017; Santos & Spinelli, 2013a) e o etiliniestriol (Canevari et al., 2016) e entre outros é de suma importância ambiental.

Um dos principais conceitos das técnicas eletroanalíticas fundamenta-se nas técnicas voltamétricas que se baseiam na medida da corrente ou do potencial mensurável, de uma substância em uma célula eletroquímica. A voltametria foi concebida no início do século XX por Heyrovsky, sendo obtida a partir da polarografia, onde o primeiro relato é dado a partir das medidas realizadas em um eletrodo de mercúrio gotejante (Pacheco et al., 2013).

As medidas voltamétricas são realizadas em células eletroquímicas, sendo a mais usual a célula que contém três eletrodos. A célula é constituída por uma solução eletrolítica e três eletrodos, sendo eles: eletrodo de referência, contra-eletrodo e eletrodo de trabalho, onde a corrente irá fluir entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. A solução eletrolítica consiste em um solvente e um eletrólito, a qual possui condutividade elétrica maior que a do solvente puro, em geral este solvente sendo uma solução aquosa dependente dos parâmetros exigidos pelo analito a ser analisado. Os eletrólitos mais utilizados nesta técnica são o NaCl, o H₂SO₄ e o NaOH, devido a capacidade destes de formar íons com facilidade, aumentando assim o gradiente de transporte de massa/carga, facilitando o transporte de íons de interesse na solução (Bard et al., 2003; Deroco & Filho, 2019; Galli et al., 2006; Nossol, 2009; Silvério, 2015).

O contra-eletrodo utilizado geralmente é o fio de platina, que tem como função principal minimizar os erros causados pela resistência da célula no controle do potencial do

eletrodo de trabalho. Usualmente o eletrodo de referência utilizado pode ser o de calomelano saturado (Hg_2Cl_2) ou prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), que tem como função principal manter o potencial constante durante as medidas eletroanalíticas, minimizando assim, os ruídos atrelados a técnica. O eletrodo de trabalho, em especial o EPC, é definido como aquele onde o analito irá sofrer as reações de oxidação e/ou redução, sendo ele diferenciado pela sua composição química (Gama & Oliveira, 2016; Pacheco et al., 2013; Shimizu et al., 2020; Švancara et al., 1997).

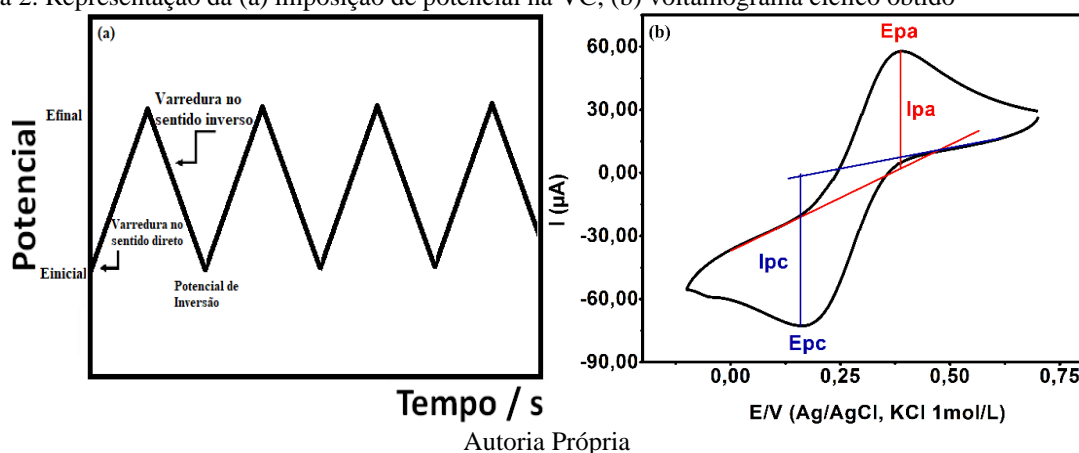
Os métodos voltamétricos dependem da medida da corrente em função de um potencial aplicado. A voltametria baseia-se na medida da corrente em uma célula eletroquímica sob condições de completa polarização de concentração, onde a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo (Pacheco et al., 2013). As voltametrias dependem do tipo de sinal de excitação observado, das quais resultam a variação do potencial aplicado (Petrovic, 2021; Skoog et al., 1988; Wang, 2006).

A voltametria pode ser realizada por diferentes tipos de imposição de variação do potencial, sendo a voltametria cíclica e a voltametria por pulso diferencial as utilizadas para a realização deste trabalho. Cada uma destas técnicas, permite obter informações qualitativas e quantitativas a respeito das espécies químicas numa solução eletrolítica e sobre os parâmetros cinéticos e termodinâmicos das reações de transferência de elétrons que ocorrem na interface eletrodo/solução (Furtado et al., 2008; Petrovic, 2021; Skoog et al., 1988; Wang, 2006). A voltametria de pulso diferencial (do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*, DPV), empregada para as análises realizadas, consiste em uma série de pulsos de amplitude constantes as quais são superpostas a rampa de potencial crescente (Furtado et al., 2008; Petrovic, 2021; Skoog et al., 1988; Wang, 2006). A voltametria cíclica (do inglês *Cyclic Voltammetry*, VC), consiste na aplicação linear de um potencial em função do tempo, é a técnica mais usada na eletroanalítica, porém com esta não é possível obter resultados quantitativos do analito. Esta se mostra eficiente para a análise dos processos de oxidação e redução do analito e como este altera a reversibilidade do par redox utilizado na solução eletrolítica (Gama & Oliveira, 2016; Pacheco et al., 2013; Shimizu et al., 2020; Silvério, 2015).

As medidas voltamétricas geram voltamogramas que dependem da metodologia utilizada para a varredura. O voltamograma cíclico é resultante de uma VC, é representado por um gráfico da corrente em função do potencial na Figura 2 (a)-(b). A Figura 2 (a) apresenta um esquema representativo da imposição de potencial na VC para a obtenção de um voltamograma

cíclico, onde está se dá linearmente em relação ao tempo de análise. Um voltamograma cíclico típico para os processos de oxirredução de espécies eletroativas é demonstrado na Figura 2 (b). Neste gráfico é possível obter informações sobre a reversibilidade do sistema como: o potencial de pico anódico (E_{pa}); a corrente de pico anódica (I_{pa}); o potencial de pico catódico (E_{pc}) e a corrente de pico catódica (I_{pc}), além de fornecer informações sobre o comportamento redox da espécie química a ser estudada (Gama & Oliveira, 2016; Pacheco et al., 2013; Petrovic, 2021; Shimizu et al., 2020; Silvério, 2015).

Figura 2. Representação da (a) imposição de potencial na VC; (b) voltamograma cíclico obtido

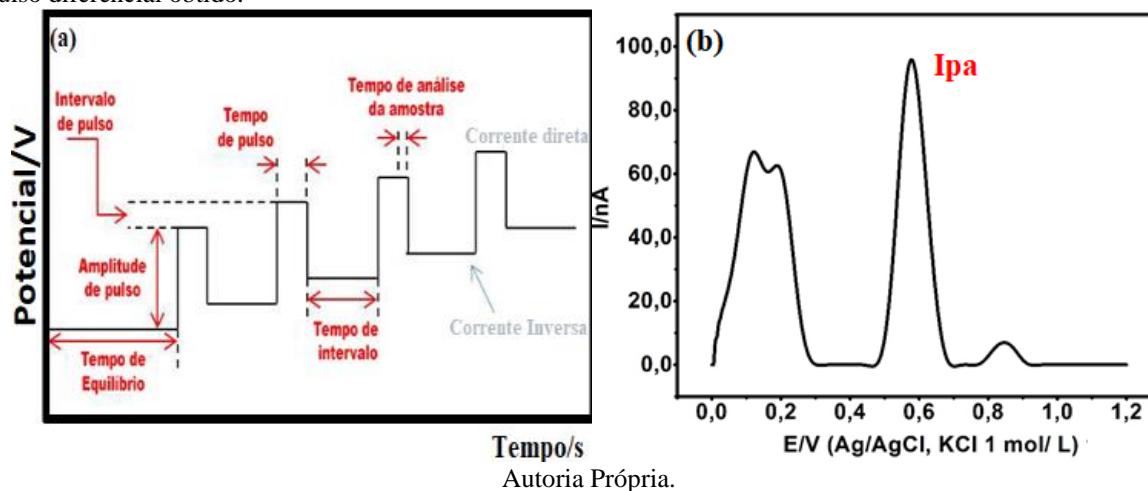


Autoria Própria

A DPV consiste na aplicação de um pulso de potencial que é superposto a uma rampa de potencial que cresce de modo linear em função do tempo. Para os experimentos eletroanalíticos a corrente de pico resultante é dada em uma magnitude proporcional à concentração do analito presente na solução, sendo possível a obtenção de uma curva analítica. Os picos presentes num voltamograma de pulso diferencial são referentes as espécies oxidadas e/ou reduzidas resultantes da aplicação de um potencial (Petrovic, 2021; Skoog et al., 1988; Wang, 2006).

Um esquema representativo de como funciona a técnica da DPV pode ser representado pela Figura 3 (a)-(b). Na Figura 3 (a) é apresentado um esquema da imposição de potencial para a DPV onde podem ser observados os parâmetros utilizados para a medida eletroanalítica relacionada a esta técnica, tendo como resultado um voltamograma de pulso diferencial, apresentado na Figura 3 (b) que apresenta os picos de oxirredução das espécies eletrogeradas após o final da imposição de potencial.

Figura 3. Representação da (a) imposição de potencial na Voltametria de Pulso Diferencial; (b) voltamograma de pulso diferencial obtido.



O tempo de pulso aplicado é variável entre 0,1 a 400 ms em uma variação da amplitude de pulso de 1 mV a 1000 mV, O tempo em que o pulso será aplicado é definido através da relação entre o intervalo dos pulsos (E_{step}) e a velocidade em que este irá ocorrer, este deve ser menor do que a metade do tempo de intervalo. Pelas definições do Software utilizado para a medida das análises voltamétricas, o tempo da análise do analito na amostra é automaticamente definido, visando assim a melhor análise. Esta relação é dada como apresentada na Equação 1:

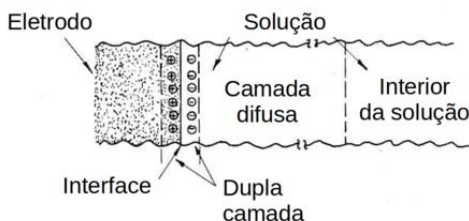
Equação 1. Relação para o tempo de pulso aplicado para a análise na DPV.

$$Tempo = \frac{E_{step}(mV)}{Velocidade\ de\ Varredura\ (mV/s)}$$

A análise voltamétrica consiste em fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada de solução imediatamente anexa a esta superfície. Os processos de transporte de massa e transferência de carga são fundamentais para entender os fenômenos que ocorrem na região de interface/solução, sendo estes caracterizados como dupla camada elétrica e camada de difusão. A Figura 4 e Figura 5 apresentam um esquema representativo da interface eletrodo/solução e dos processos que ocorrem dentro da camada de difusão da solução eletrolítica. A representação da interface eletrodo/solução é apresentada na Figura 4 onde está apresentado um esquema representativo da superfície do eletrodo de trabalho em contato com a camada difusa da solução (fase pobre em íons do analíto), onde os fenômenos medidos se dão na camada adjacente, sendo ela a dupla camada elétrica. O interior da solução (seio da solução) apresenta uma maior concentração de íons, onde há uma fase mais rica em

íons do analíto, a migração dos íons flui do interior da solução para a cama difusa (Bard et al., 2003; Faulkner, 1983).

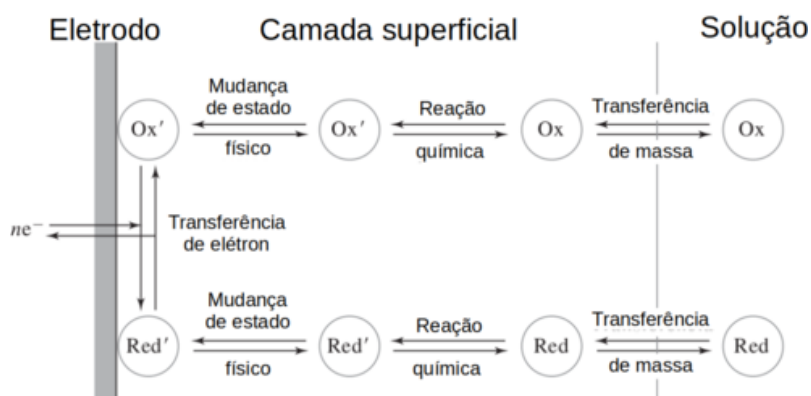
Figura 4. Representação da interface eletrodo/solução



Adaptada de Faulkner, 1983

A Figura 5 apresenta os processos de oxirredução do analíto de interesse que ocorrem na camada de solução adjacente ao eletrodo, sendo está a camada de difusão, onde os processos de oxirredução do analíto de interesse são dados. Podem ocorrer os processos de eletrodeposição do analíto de interesse sobre a superfície do eletrodo de trabalho, podendo ser ela dada de maneira reversível ou irreversível, dependendo da natureza deste.

Figura 5. Representação dos processos que ocorrem na camada de difusão.



Adaptada de Bard et al., 2003

Dentre os diversos tipos de eletrodos de trabalho utilizados nas técnicas eletroanalíticas, destacam-se os eletrodos de pasta de carbono (EPC). O EPC foi desenvolvido para as medidas voltamétricas com aplicação de potenciais mais positivos permitindo principalmente a análise de compostos orgânicos. A partir disto, este eletrodo tem recebido uma atenção maior e um desenvolvimento considerável para a sua aplicação na eletroanalítica, o qual está relacionado, diretamente, as várias vantagens, tais como: o seu baixo custo, a sua alta sensibilidade e a característica de sua superfície ser renovável (Behpour et al., 2010; Gholivand & Parvin, 2011).

O EPC faz parte de uma categoria de substrato condutor, denominado como material compósito, sendo ele uma mistura formada pela combinação de duas ou mais fases de naturezas diferentes (Behpour et al., 2010; Gama & Oliveira, 2016; Gholivand & Parvin, 2011; Shimizu et al., 2020). Quando uma das fases do material compósito está na escala nanométrica, este pode ser denominado um nanocompósito. O material compósito trata-se da mistura do pó de grafite com um líquido orgânico imiscível, conhecido como aglutinante. Alguns dos pré-requisitos para a utilização do pó de grafite é que este deve apresentar alta pureza química, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e de impurezas eletroativas e ter distribuição granulométrica uniforme (Behpour et al., 2010).

A função do aglutinante é dar consistência a pasta de carbono, preenchendo os interstícios presentes entre as partículas componentes deste compósito. O aglutinante deve ter também características específicas, como ser eletroativo, ser imiscível em água, baixa volatilidade e de não conter impurezas. Entre os aglutinantes mais utilizados podem-se destacar alguns materiais, como a parafina, o querosene, a graxa de silicone e o óleo mineral puro (Atta et al., 2011; Behpour et al., 2010; Gholivand & Parvin, 2011). A quantidade de aglutinante na pasta de carbono é um parâmetro bastante estudado, pois a sua proporção na mistura tem uma forte influência na reatividade do eletrodo. Os eletrodos que apresentam uma maior quantidade de aglutinante possuem a taxa de transferência de elétrons menor, em contrapartida, os eletrodos que apresentam menores ou até mesmo a ausência de aglutinantes possuem uma taxa de transferência de elétrons maior (Cunha et al., 2003; Vaz et al., 1996).

Os eletrodos de pasta de carbono permitem que haja a modificação interna do material eletródico, sem que haja a mudança estrutural do material compósito (Gama & Oliveira, 2016; G. M. de Oliveira et al., 2005; Silvério, 2015). Os modificadores têm como função aumentar a sensibilidade dos eletrodos, e podem ser incorporados a pasta de carbono por adição direta, onde certa quantidade controlada do modificador é adicionada ao material compósito (Tsai et al., 2013). Os eletrodos modificados são em sua maioria utilizados para as técnicas voltamétricas ou amperométricas.

1.3. Biossensor

Os biossensores são dispositivos capazes de detectar rapidamente os analitos de interesse, sendo eles espécies químicas e/ou biológicas, tanto qualitativa como quantitativamente. Esses dispositivos estão sendo atualmente visados e estudados, pois, podem ser aplicados em diversas áreas, como na saúde, na ambiental e na prevenção de bioterrorismo.

Estes dispositivos combinam um componente que irá interagir com um substrato alvo, podendo ser um componente biológico ou um derivado sintético que mimetiza funções biológicas, a um transdutor físico, que irá converter os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis, onde o componente ou o elemento sensor tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito (Horisberger & Rosset, 1977; Pirich et al., 2017).

Na superfície sensora de um biossensor podem ser aplicados tanto materiais inorgânicos (Nps metálicas ou de óxidos), quanto materiais orgânicos (anticorpos, ácidos nucleicos). Essa interação resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas que serão detectadas e medidas pelo transdutor. O principal objetivo do biossensor é o de produzir um sinal correspondente em magnitude e/ou frequência à concentração de um determinado analito. Os biossensores são construídos a partir de: componente que introduz a amostra, sistema de reconhecimento molecular, transdutor e unidade processadora de sinal (Furtado et al., 2008).

Há dois tipos principais de biossensores, os dispositivos de bioafinidade e os dispositivos bioanalíticos, e estes dependem estritamente da natureza do componente de reconhecimento. Os dispositivos de bioafinidade dependem diretamente da ligação seletiva do analito-alvo ao componente disponível à sua superfície, diferenciando-se dos dispositivos bioanalíticos, onde o reconhecimento é dado quando há a imobilização de uma enzima que se liga ao substrato alvo, gerando os sinais mensuráveis (Bard et al., 2003; Periasamy et al., 2009; Petrovic, 2021; Satpati & Bard, 2012; Skoog et al., 1988).

O transdutor nos biossensores age como um mediador, sendo este a interface que mede as mudanças físicas e/ou químicas que ocorrem na reação com o receptor sensível ao analito de interesse. O transdutor transforma a energia gerada pela reação de reconhecimento em um produto mensurável, podendo ser massa, carga, dissipação ou absorção de calor e a luz. Podem existir variados tipos de transdutores, onde o transdutor eletroquímico, baseado no movimento dos íons na difusão das espécies eletroativas, é aquele que será dado enfoque neste trabalho (Periasamy et al., 2009). Este transdutor pode ser utilizado nos testes de monitoramento e diagnóstico em análises clínicas, e pode ser dividido em três campos distintos, sendo eles os tradutores amperométricos (Periasamy et al., 2009; Petrovic, 2021; Skoog et al., 1988) (medida de corrente resultante da oxidação/redução eletroquímica de uma espécie eletroativa), potenciométricos (Petrovic, 2021) (diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo) e condutimétricos (Atta et al., 2011; Galli et al., 2006; Periasamy et al., 2009; Tkach et al., 2019; Vaz et al., 1996) (mudanças da condutância devido ao uso das enzimas que produzem espécies iônicas ao catalisar as reações). Análises em nanoescala têm ganhado uma

maior visibilidade uma vez que permitem o estudo das interações em escala nanométrica dado em tempo real, propiciando aos pesquisadores alguns biossensores com uma maior sensibilidade ao se comparar aos métodos usuais (Wang, 2006).

Inúmeros tipos de dispositivos baseados nos princípios da nanotecnologia têm sido incorporados aos biodispositivos com o intuito de aumentar a relação sinal/ruído, de reduzir o tempo de resposta e de aumentar a estabilidade e a sensibilidade do método, podendo assim obter limites de detecção e quantificação em concentrações entre micromolar e nanomolar quando em comparação aos eletrodos convencionais (Skoog et al., 1988; Vaz et al., 1996; Wang, 2006). As Nps, os nanofios e os nanotubos vêm sendo amplamente aplicados a estes biodispositivos como nanomatrizes, nanobiossensores e sistemas microanalíticos. Nanobiossensores podem atuar em fases gasosas ou líquidas e utilizam os regimes de medição a baixa tensão, e podem detectar ligantes diretamente, não havendo necessidade de marcadores exorbitantes e de difícil manuseio. Estas características proporcionam aos nanobiossensores um menor custo de obtenção e a sua reprodutibilidade possibilitando o uso destes em diversas situações para detecção e monitoramento (Codognoto et al., 2004; Skoog et al., 1988; Wang, 2006).

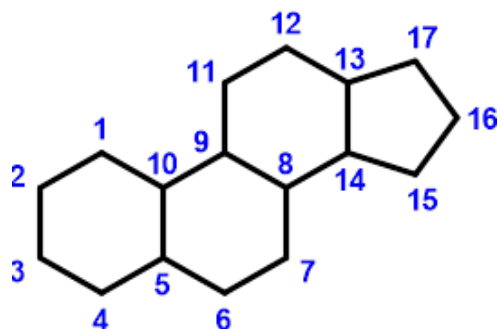
Os nanobiossensores vêm conquistando um espaço apreciável no campo das análises ambientais e biomédicas. Como consequência disto é possível notar a ampliação das suas possibilidades na detecção de substâncias exógenas aos ambientes que afetam diretamente o equilíbrio do mesmo. Os agentes endócrinos como os hormônios descartados de forma errônea em rios são bons exemplos disso. Estes agentes interferem diretamente no sistema reprodutor dos peixes, afetando toda a fauna de forma negativa (Canevari et al., 2016; Cesarino et al., 2015; Cincotto et al., 2014a; Cincotto & Machado, 2017; Machado et al., 2010). Quando não há o devido controle destes no tratamento dos efluentes, afeta diretamente o ser humano pela ingestão passiva dos mesmos, causando disfunções hormonais consideravelmente perigosas. Os nanobiossensores estão sendo bem visados, pois podem se tornar aparelhos baratos e de fácil acesso, semelhantes àqueles usados na medição das taxas de glicose no sangue, facilitando a detecção e quantificação de agentes nocivos à saúde pública (Kohles et al., 2011)

1.4. Desreguladores Endócrinos – 17-β-estradiol

Os hormônios são classificados como proteínas derivadas de aminoácidos ou de esteroides. De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), a classe dos esteroides é dada por uma estrutura básica, sendo ela a do ciclo(α)fenantreno,

representado na Figura 6. Esta estrutura pode diferenciar-se em questão das ligações ou dos grupos substituintes (metilas, carbonilas, hidroxilas), que irá gerar diferentes esteroides, dando origem então a uma ampla série de hormônios esteroidais (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Teixeira Verbinnen et al., 2010; Zhu et al., 2015).

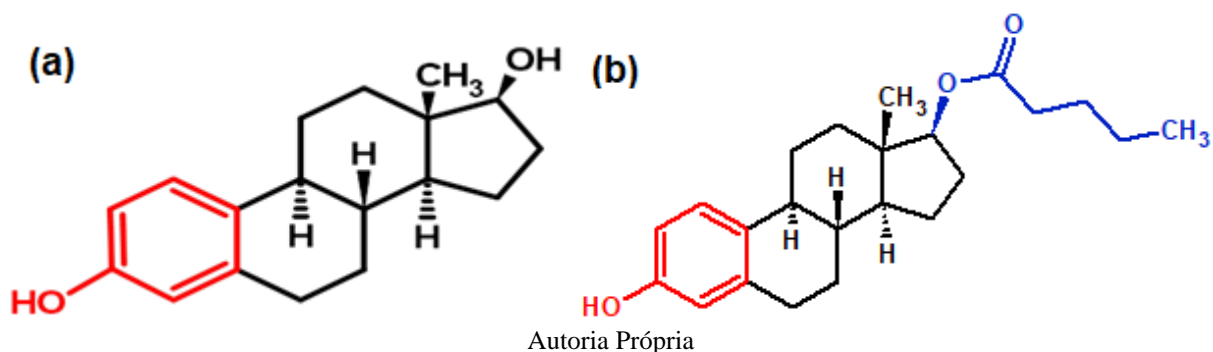
Figura 6. Estrutura básica dos hormônios esteroides.



Autoria Própria

Entre os hormônios esteroides, há os hormônios designados hormônios sexuais femininos, ou HSFs. Os HSFs podem ser naturais como o 17- β -estradiol, a Estrona e o Estriol; sintéticos como o 17 α -Etilenestradiol e a progesterona. O 17- β -estradiol, que irá ser estudado neste trabalho, mais conhecido como Estradiol ou Valerato de Estradiol (VE), tem sua estrutura molecular representada na Figura 7 a). É um hormônio sexual produzido em grande quantidade por mulheres cisgênero de forma natural nos ovários, ou em pequena quantidade por homens no córtex adrenal (Cincotto & Machado, 2017; Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Sacht et al., 2016; Yakabe et al., 2005). O hormônio 17- β -estradiol pode ser estudado através do comportamento do composto químico VE, apresentado na Figura 7 (b), sendo este composto resultante da esterificação do hormônio natural 17- β -estradiol

Figura 7. Fórmula estrutural do (a) 17- β -estradiol e (b) Valerato de Estradiol.



Autoria Própria

Este hormônio pode ser excretado para a natureza, tanto por mulheres cisgênero por mulheres transgênero, que passam por terapia hormonal para diminuir os efeitos da menopausa, ou ganharem características mais femininas respectivamente. Também pode ser excretado por homens com disfunções hormonais, ou homens transgênero que não fazem tratamento hormonal (Cesarino et al., 2015; Cincotto et al., 2014b; Cincotto & Machado, 2017; Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Nossol, 2009). O estradiol tem como função principal o auxílio na formação das características sexuais secundárias, como o crescimento das mamas e na regulamentação do ciclo menstrual e a maturação dos espermatozoides. De acordo com a literatura, também foi conferido ao estradiol a influência em muitos outros sistemas no âmbito fisiológico, onde podem-se incluir o desenvolvimento encefálico, a coagulação sanguínea e ajuda no crescimento ósseo (Canevari et al., 2016; Cesarino et al., 2015; Cincotto et al., 2014a; Cincotto & Machado, 2017; Machado et al., 2010). Este hormônio pode se encaixar em uma classe de substância muito distinta, denominada de desreguladores endócrinos, caso não haja a regulamentação necessária e o controle de sua incidência no ambiente.

Os desreguladores endócrinos são substâncias exógenas que causam desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino, independentemente se elas atuam diretamente no sítio receptor sináptico ou não. São substâncias químicas, naturais (de origem animal ou vegetal) ou produzidas laboratorialmente, que interferem no sistema endócrino, podendo produzir efeitos adversos no desenvolvimento, na reprodução e em funções neurológicas e por muitas vezes respostas imunológicas. Estes desreguladores tem a função de mimetizar os hormônios (sendo estes estrógenos, andrógenos, hormônios da tireoide), gerando a superestimulação no organismo, uma vez que se ligam aos receptores hormonais e atuam de forma agonista ou antagonista ao que este foi pré-designado, mudando as funções principais daquele sistema, podendo causar doenças (Canevari et al., 2016; Cesarino et al., 2015; Cincotto & Machado, 2017; Santos & Spinelli, 2013a). A sua baixa solubilidade em água e sua alta lipossolubilidade dos desreguladores endócrinos pode acarretar a bioacumulação destes no organismo, por meio do tecido adiposo.

A Figura 8 apresenta os valores encontrados na literatura para os limites de exposição do Hormônio natural 17- β -Estradiol, onde o limite de ingestão tolerável e a menor dose para o aparecimento de efeitos indesejados é observado em 0,30 mg/L. Os HSFs atualmente são os desreguladores endócrinos que vem despertado a maior preocupação ambiental, devido a excreção destes hormônios ter aumentado em função do uso de anticoncepcionais por mulheres e de terapia hormonal para aqueles indivíduos que passam por algum tipo de desordem. A Figura

9 mostra os níveis de excreção diárias em μg dos HSFs mais prejudiciais ao meio ambiente, quando não regulamentados (Brandt et al., 2020; Canevari et al., 2016; Cincotto et al., 2014a; Santos & Spinelli, 2013b).

Figura 8. Valores encontrados na literatura para os limites de exposição do 17- β -estradiol

Composto	Tipo de estudo	Efeito crítico	Dose experimental ($\mu\text{g}/\text{kg pc.d}$)	Fator de incerteza	IDT ($\mu\text{g}/\text{kg pc.d}$)	FA ¹	Valor-guia ¹ ($\mu\text{g}/\text{L}$)
17- beta-estradiol - E2 (hormônio natural)	Estudo epidemiológico com mulheres na pós-menopausa recebendo reposição hormonal.	Concentrações séricas de hormônio folículo-estimulante, angiotensinogênio, globulina de ligação a hormônios sexuais e do corticoesteróide.	5 (NOAEL)	100	0,050	0,2	0,30
	Estudos dose-resposta com ratos.	Desenvolvimento de câncer de mama, útero e mesentério.	1/39.000 (fator de inclinação)	10 ⁻⁵ (risco de câncer)	-	-	0,008
Estrona - E1 (hormônio natural)	Estudo epidemiológico com mulheres na pós-menopausa recebendo reposição hormonal.	Resposta hormonal estrogênica.	5 (NOAEL)	100	0,050	0,2	0,30
	Estudo de 2 semanas com humanos.	Sistema endócrino e fígado.	4 (NOAEL)	300	0,013	0,2	0,078
	Menor dose terapêutica diária (0,6 mg/d).	Efeito terapêutico.	10 (MDTD)	10.000	0,0010	0,2	0,0060

IDT: Ingestão diária tolerável; FA: fator de alocação da IDT para a exposição via consumo de água; NOAEL: dose para efeito adverso não observado: nível de exposição mais elevado para o qual não se observam efeitos adversos; LOAEL: menor dose para efeito adverso observado: nível de exposição mais baixo para o qual se observam efeitos adversos; MDTD: menor dose terapêutica diária de um medicamento; BMDL10: limite inferior do efeito crítico da dose efetiva *benchmark* (associada ao limite inferior com confiança estatística de 95% para o nível de exposição que incrementa em 10% o risco abaixo do menor efeito adverso).

Fonte Brandt et al., 2020

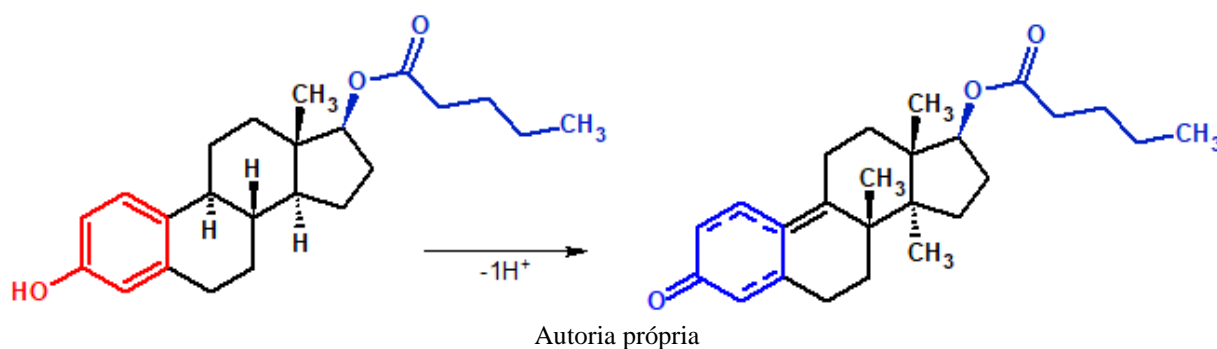
Figura 9. Níveis de Excreção diária por indivíduos saudáveis.

Excreção ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	17- β -Estradiol	Estrona	Estriol
Homens	1,6	3,9	1,5
Mulheres em menstruação	3,5	8,0	4,8
Mulheres em menopausa	2,3	4,0	1,0
Mulheres em gestação	259	600	6000

Adaptado de Machado et al., 2010

O Valerato de Estradiol ($C_{23}H_{32}O_3$), possui uma massa molar de 356,498 g/mol, com ponto de fusão de 178,5 °C, tendo uma solubilidade moderável em água, de acordo com o coeficiente de partição (n-octanol/água) em 4,01, porém altamente solúvel em etanol e metanol. É uma das formas esterificadas do estrógeno que é metabolizado no fígado das mulheres e tem meia-vida de cerca de 13 horas. A sua principal fonte de excreção é dada na urina e este é comercializado na forma de comprimidos, pomadas e adesivos para a regulação hormonal, sendo está devidamente acompanhada por profissionais da saúde. Possui um alto efeito estrogênico, sendo muito maior do que os derivados estrona e estriol, podendo chegar a cerca de 1000 vezes o efeito deste último. É o principal esteroide estrogênico, análogo ao 17- β -estradiol que é produzido durante o ciclo menstrual e a alteração dos níveis deste hormônio são os responsáveis pela regulação deste período. Um dos métodos de detecção para do 17- β -Estradiol pode ser dado através de amostras de água residuais de tratamento é dado pela detecção eletroquímica do VE, que é baseada na reação de oxidação do grupo fenol, como mostrado na Figura 10, onde é apresentado o esquema da oxidação irreversível do VE, tendo como produto uma cetona (Cincotto et al., 2014a; Cincotto & Machado, 2017).

Figura 10. Representação da Oxidação do Valerato de estradiol.



2. JUSTIFICATIVA

Neste projeto foi desenvolvido um método eletroanalítico para detecção do hormônio estrogênico em urina sintética. O 17- β -Estradiol é um hormônio natural secretado por mulheres em alta quantidade durante o ciclo hormonal e por homens em pequena quantidade quando há a disfunção do sistema endócrino. O VE é um dos derivados sintéticos disponíveis para uso em tratamentos hormonais, obtido em formulações farmacêuticas, aqui sendo utilizado para o estudo da detecção por meio de um biossensor eletroquímico, que visa entender o funcionamento dessa substância quando em solução em pH equivalente aquele presente na urina humana e visa a detecção do seu similar estrutural 17- β -Estradiol, sendo este dado pelo princípio ativo VE. Este estudo visa contribuir para o desenvolvimento de eletrodos modificados para o uso das técnicas eletroanalíticas buscando associar a produção de novas tecnologias na área da biomedicina, em especial aquela aplicada a detecção hormonal.

Os eletrodos de pasta de carbono vêm sendo aplicados em diversas áreas da ciência, devido a sua facilidade de obtenção e da sua posterior modificação, podendo estes serem modificados com diversos agentes, tendo modificadores de origem orgânica ou inorgânica. A aplicação dos nanocompósitos inorgânicos de grafite e Nps para o desenvolvimento de biossensores é cada vez mais visada, pois o grafite é capaz de adsorver com facilidade os agentes inorgânicos, sem mudar a sua estrutura funcional primária que possibilita a exposição dos mesmos ao meio reacional, garantindo a rápida detecção do analito a ser estudado no meio eletrolítico (Atta et al., 2011; Behpour et al., 2010; Moreira et al., 2018; Satpati & Bard, 2012; Zhu et al., 2015).

A aplicação de Nps em sensores eletroquímicos vem sendo estudada ao longo dos anos e tem-se obtido resultados reprodutíveis e favoráveis a miniaturização dos processos. Ao diminuir o tamanho de um material específico, no caso deste trabalho o ouro e o óxido de silício, pode-se obter propriedades distintas do material em escala macroscópica, como uma maior área superficial de contato. Portanto, é esperado que estes materiais tenham uma maior reatividade sendo possível a posterior aplicação dos mesmos na obtenção de biossensores. É possível observar que há um aumento do sinal analítico mensurável pois cada nanopartícula funciona como um eletrodo separado, o que melhora consideravelmente o transporte de massa/carga na solução eletrolítica, devido a sua contribuição na difusão radial, e também, a razão do sinal/ruído devido a sua baixa resistência interna (Montes, 2015; Moraes et al., 2015; Periasamy et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este projeto teve como objetivo a síntese de nanopartículas de ouro e de óxido de silício para confecção de eletrodos modificados de pasta de carbono para detecção eletroanalítica de 17- β -estradiol.

3.2. Objetivos Específicos

- i) Sintetizar Nanopartículas de Ouro pelo método de Turkevich e Nanopartículas de Óxido de Silício pelo método de Stöber;
- ii) Caracterizar morfológicamente o pó de grafite sem modificação e modificado com Nanopartículas de Ouro;
- iii) Caracterizar Morfológicamente a Nanopartícula de Óxido de Silício;
- iv) Caracterizar as propriedades estruturais e óticas por FT-IR e UV-Vis do óxido de Silício e do Valerato de Estradiol e Nanopartículas de Ouro;
- v) Investigar voltametricamente o comportamento eletroquímico do emprego das nanopartículas de ouro e silício na pasta de carbono em solução contendo Valerato de Estradiol em tampão PBS;
- vi) Investigar a influência da concentração do surfactante dodecil sulfato de sódio para o aumento da razão sinal/ruído da curva analítica em tampão PBS e urina sintética;
- vii) Realizar testes com o eletrodo de pasta de carbono modificada e sem modificação para determinar o Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) que o método proposto pode oferecer;
- viii) Avaliar o emprego do eletrodo modificado na quantificação do 17- β -estradiol;

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes reagentes: KH_2PO_4 (Isofar); NaCl (Vetec); $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Synth); $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Vetec); pó de grafite de 20 μm (Aldrich®); óleo mineral (Isofar®); CH_3OH (Alphatec); $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ (Dinâmica); Na_2SO_4 (Synth); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Dinâmica); $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (Synth); NH_4Cl (Produquimica); KCl (Produquimica); Valerato de Estradiol (17- β -estradiol), $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$ (Produquimica); Na_2HPO_4 (Isofar); NaH_2PO_4 (Vetec); NH_4OH (Synth); Água deionizada. Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico e foram usados como recebidos.

4.2. Solução Estoque de Valerato de Estradiol (VE)

O princípio ativo Valerato de Estradiol foi obtido em farmácia de manipulação na forma pura sem excipientes, contendo 1 g de Valerato de Estradiol (17- β -estradiol), apresentando uma coloração branca e livre de impurezas com massa molar de 356,498 g/mol, não necessitando de uma preparação prévia da amostra para a utilização desta.

As soluções estoquem de Valerato de Estradiol foram preparadas na concentração de 1×10^{-2} mol/L em metanol, água deionizada e etanol em balões volumétricos de 10 mL. Os balões foram homogeneizados em banho ultrassônico por 20 minutos e armazenados em vidro âmbar sob refrigeração para posterior uso nas análises. Soluções diluídas (entre 1×10^{-6} e $3,4 \times 10^{-4}$ mol/L) de Valerato de Estradiol da solução estoque foram preparadas imediatamente antes das análises.

4.3. Solução de Tampão Fosfato

A solução de Tampão fosfato (PBS) utilizado como eletrólito suporte foi preparada utilizando-se 2,9 g de NaH_2PO_4 e 5,16 g de Na_2HPO_4 a cada 100 mL, resultando numa solução tampão PBS 0,100 mol/L (pH 7,0).

4.4. Solução de Urina Sintética (U.S.)

A urina sintética foi preparada de acordo com o método proposto por Laube (Laube et al., 2001), utilizando as massas de 0,73 g de NaCl , 0,40 g de KCl , 0,28 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,56 g de Na_2SO_4 , 0,35 g de KH_2PO_4 , 0,25 g de NH_4Cl e 6,25 g de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ para cada 250 mL,

respectivamente foram adicionadas a um balão volumétrico de 100 mL usando-se imediatamente após a preparação. O pH da Urina Sintética obtida era de 5,0.

4.5. Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

As soluções de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foram preparadas a partir de uma solução estoque 1×10^{-2} mol/L, onde a diluição seriada variava de 1×10^{-7} a 1×10^{-3} mol/L e uma solução preparada na concentração micelar crítica (CMC) de 8×10^{-3} mol/L. As soluções foram homogeneizadas em banho ultrassônico por 10 minutos.

4.6. Síntese de Nanopartículas de Ouro (NpAu)

Em um béquer foi adicionado 98,0 mL de água deionizada sob agitação magnética e aquecimento até atingir 90°C. Adicionou-se 1,0 mL da solução do HAuCl_4 ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$) e 1,0 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ($0,3 \text{ mol. L}^{-1}$). A solução coloidal foi mantida a 90 °C por 15 minutos até o surgimento da coloração vermelha aparecesse (Gorup et al., 2011). As NpAu foram transferidas para um tubo do tipo Falcon e em seguida estas foram lavadas com água deionizada, descartando-se o sobrenadante a cada lavagem, estas foram centrifugadas em uma centrífuga NT 825 Centrífuga Refrigerada (Novatecnica™), com ciclo de 1 hora, a 5900 rpm e temperatura a 5 °C, com repetição de 3 ciclos, a fim de retirar o excesso de citrato do meio reacional para posterior incorporação no pó de grafite.

4.7. Síntese das Nanopartículas de Óxido de Silício (NpSiO₂)

Preparou-se uma solução de 0,02 mol de TEOS em 100 mL de etanol anidro em um Erlenmeyer. Preparou-se 0,03 mol de uma solução aquosa de NH_4OH em um Erlenmeyer. Verteu-se a solução aquosa de NH_4OH na solução alcóolica de TEOS e a solução resultante permaneceu sob agitação por 24 h em temperatura ambiente. Posteriormente, a dispersão coloidal foi centrifugada, lavada com etanol para eliminação dos reagentes iniciais e seca em placa de petri a 50 °C para a posterior incorporação pó de grafite (Arantes et al., 2012)

4.8. Preparo dos Eletrodos de Pasta de Carbono

Para o preparo dos pós de grafite modificados utilizou-se a solução coloidal de Nanopartículas de Ouro (NpAu) e Nanopartículas de óxido de Silício (NpSiO₂) após a secagem das mesmas.

As NpAu foram incorporadas ao pó de grafite na forma de solução coloidal na proporção 1:1 massa/massa. Após a incorporação, a pasta aquosa resultante foi seca a 60 °C por 24 horas. Para a preparação do pó de grafite modificado com NpSiO₂ foi-se utilizada a proporção em massa de 1% de NpSiO₂ para a massa de pó de grafite desejada.

A pasta de pó de grafite com ou sem modificação foi obtida pela maceração em almofariz de ágata do pó de grafite 20 µm (Aldrich) contendo ou não os modificadores com o óleo mineral como aglutinante na proporção 70/30 massas/massas. A massa total do eletrodo foi definida como sendo 0,500 g de pasta de carbono oleosa.

A morfologia dos pós de grafite sem modificação e com NpAu, assim como a morfologia da NpSiO₂, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV ou SEM) em um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM) trabalhando a 30 kV em parceria com o LIEC-São Carlos.

4.9. Planejamento Fatorial

Devido as diversas variáveis que podem influenciar direta ou indiretamente nas análises eletroanalíticas, foi proposto um planejamento fatorial 2⁵⁻², a fim da investigação dos parâmetros da técnica sobre a corrente de pico do 17-β-estradiol, onde buscava-se a maior razão sinal/ruído, em soluções com e sem a adição do SDS.

Os parâmetros da técnica de DPV, analisados foram: i) tempo de pulso, ii) amplitude de pulso, iii) tempo de equilíbrio, iv) velocidade de varredura e v) intervalo de pulso (Tabela 1). A Tabela 2 apresenta as configurações experimentais para o planejamento fatorial 2⁵⁻², em acordo aos níveis das variáveis apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Relação das Variáveis utilizadas para a confecção do planejamento fatorial.

Variável	Nível	
	-1	+1
Tempo de Pulso / s	60	80
Amplitude de Pulso / mV	40	50
Tempo de Equilíbrio / s	15	20
Velocidade de Varredura / mV s ⁻¹	10	20
Intervalo de Pulso / mV	2	5

Tabela 2. Configuração do planejamento fatorial 2^{5-2} (-1) menor nível e (+1) maior nível.

Ensaio	V1	V2	V3	(V1×V2×V3)	(V1×V2)
				V4	V5
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1
8	1	1	1	1	1

4.10. Caracterização física e química dos materiais

A caracterização física e química das NpAu e do VE foi realizada através da técnica de espectroscopia de absorção na região do UV-Visível. As características estruturais da NpSiO₂ e do VE foram realizadas através de da técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). As caracterizações do pó de grafite puro e com NpAu, foram realizadas por: espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS); microscopia eletrônica de varredura (MEV); espectroscopia de espalhamento Raman conforme a necessidade de investigação dos componentes do material composto.

As medidas foram realizadas em parceria com o LIEC-São Carlos e também com equipamentos da Universidade Federal de Jataí, alocados no Laboratório de Pesquisa da Pós-graduação.

As medidas de Uv-Vís foram realizadas em um espectrofotômetro Evolution 220 Thermo Scientific, utilizando o solvente metanol com intervalo de 200 a 800 nm em uma cubeta de Quartzo de 1 cm de caminho óptico, com largura de banda de 1 nm.

As medidas de FT-IR foram realizadas no modo de absorbância e as medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Jasco Modelo 4100 com transformada de Fourier com espectros coletados na região de 4000 – 400 cm⁻¹, com 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹ e intervalos de 2 cm⁻¹.

As imagens de MEV e EDS foram obtidas em um microscópio Zeiss Supra 35VP trabalhando a 30 kV. As Nps também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas em um microscópio Philips CM 120, com filamento termo-iônico de LaB6 (alto brilho), voltagem de aceleração de 120 KV e resolução pontual de

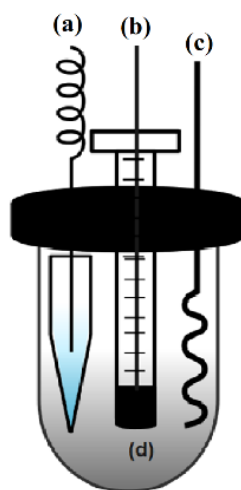
1,7Å. As amostras foram depositadas em uma grade de cobre coberta com uma fina camada de carbono.

As Nps, na forma de pó, foram analisadas por espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) utilizando um espectrômetro Bruker RFS100, com laser ND-YAG (1064 nm), usando uma potência de 150 mW, região de 100-2000 cm^{-1} , com 32 varreduras e resolução de 2 cm^{-1} em temperatura ambiente.

4.11. Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos de Trabalho

Para o estudo eletroquímico foi utilizada uma célula eletroquímica apresentada na Figura 11 contendo três eletrodos: eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl, KCl 1,0 mol/L); contra eletrodo (fio de platina) e eletrodo de trabalho (EPC), contendo NpSiO_2 NpAu ou sem modificador. Empregou-se um potenciostato/galvanostato IVIUM modelo Compactstat 800 mA/10V para as medidas voltamétricas e o Software Livre IviumSoft para o tratamento de dados.

Figura 11. Representação da célula eletroquímica contendo 3 eletrodos: (a) eletrodo de referência; (b) eletrodo de trabalho (EPC); (c) contra eletrodo; (d) solução eletrolítica



Autoria Própria

O estudo eletroquímico foi realizado por VC, e DPV, realizando-se o polimento da superfície com papel manteiga sempre antes de cada medida (Gama & Oliveira, 2016; Shimizu et al., 2020). O EPC sem modificação foi utilizado a fim da comparação quantitativa e qualitativa com relação a sensibilidade dos eletrodos modificados com NpAu e NpSiO_2 .

A célula eletroquímica era constituída de um tubo pequeno de 8 cm de altura com tampa, sendo este de Poliestireno (PS) e Polipropileno (PP) com volume de eletrólito utilizado de 10

mL. Esta foi envolta em papel alumínio a fim de minimizar o efeito da luz sobre o sistema, a temperatura do ambiente foi controlada em 20 °C para todas as medidas realizadas. A solução eletrolítica constituída pela solução de VE 1×10^{-4} mol/L em PBS 0,100 mol/L (pH 7,0) foi utilizada para a avaliação do perfil de oxirredução do analito através da VC.

Posteriormente com a proporção de 1:1 de PBS/Urina sintética (v/v) foi observado se a presença da urina sintética/SDS apresentava alguma reação de oxirredução que interferisse na identificação do 17- β -estradiol. As medidas para a avaliação da melhor concentração de SDS na razão Sinal/Ruído foram dadas na curva de concentração de 1×10^{-7} a 1×10^{-3} mol/L de SDS e uma solução de 8×10^{-3} mol/L de SDS na solução de PBS/Urina Sintética, utilizando a VC e a DPV.

4.12. Curva de Calibração do Valerato de Estradiol

A curva de calibração univariada nas diferentes concentrações de Valerato de estradiol foi dada através da DPV para os diferentes eletrodos numa solução eletrolítica de VE/urina sintética/PBS sem ou com SDS, onde a melhor razão sinal/ruído foi obtida. Utilizou-se a solução estoque 1×10^{-2} mol/L de VE na curva de adição de alíquotas da solução padrão mantendo-se o volume com o menor erro percentual atrelado a técnica.

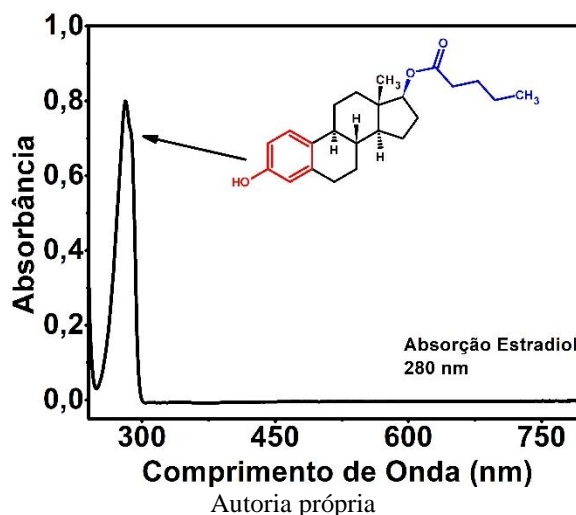
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterizações Físicas e Químicas dos Materiais

Inicialmente foram preparadas soluções $1,00 \times 10^{-2}$ mol/ L de VE em diferentes solventes, sendo eles: água deionizada, etanol e metanol, essas foram colocadas em banho ultrassônico por 20 minutos e no final do tempo decorrido foram observadas as características da solução, quanto a dispersão do VE e a sua solubilidade. Foi possível observar que a melhor solubilidade foi obtida quando o VE estava na presença de metanol, que continuou solúvel na solução mesmo com a refrigeração da mesma. Para a caracterização deste composto, foram utilizadas duas técnicas, a espectroscopia de absorção no UV-Visível e a espectroscopia de FT-IR.

Com a técnica de espectroscopia de absorção na região do UV-visível foi possível caracterizar as bandas de absorção no UV-Vis do VE para confirmar a pureza deste composto químico. A absorção de energia depende unicamente da estrutura eletrônica da molécula, e por isso, a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis tem ampla aplicação na caracterização de uma série de propriedades de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Como a energia absorvida pela molécula é quantizada sendo ela orgânica ou inorgânica o espectro de uma única transição eletrônica deveria corresponder a uma linha discreta, porém, esta previsão não se confirma, dado que a absorção eletrônica se sobrepõe a subníveis rotacionais e vibracionais, assim, um espectro de UV-Vis tem o aspecto de uma banda larga (Skoog et al., 1988). A Figura 12 apresenta o espectro de Uv-Vis para o VE e sua banda característica em 280 nm (Bergamin & Sotomayor, 2017; Machado et al., 2010; Martinez et al., 2017; Sacht et al., 2016; Silva & Costa Júnior, 2014; Skoog et al., 1988)

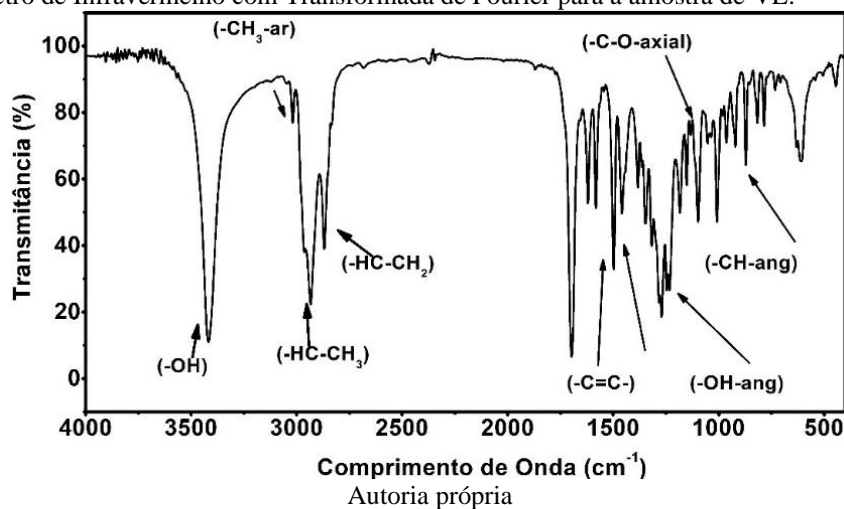
Figura 12. Espectro de Uv-Vis de Valerato de Estradiol na solução de Metanol.



O VE possui em sua estrutura molecular o grupo hidroxila (-OH) e a posição deste grupo fenólico da molécula é responsável pela considerável alta afinidade de ligação com o receptor sináptico seletivo para estrógenos. De acordo com a literatura foi possível observar na análise de UV-Vis a banda de absorbância do VE em 280 nm que está relacionada a aromaticidade do anel fenólico, corroborando com dados existentes na literatura para tal composto (Bergamin & Sotomayor, 2017; Machado et al., 2010; Martinez et al., 2017; Sacht et al., 2016; Silva & Costa Júnior, 2014; Skoog et al., 1988). Confirmando que não há picos referentes a impurezas nesta substância, onde a banda de absorção de metanol puro de 205 nm foi desconsiderada através do branco da solução para a realização da medida.

A partir da espectroscopia de absorção no Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) é possível caracterizar a estrutura do composto VE. As bandas de Infra-Vermelho apresentadas na Figura 13 localizadas entre 3417-3030 cm^{-1} são características da deformação axial -OH devido a ligação de hidrogênio intermolecular, enquanto o estiramento do grupo carbonila é observado em 1670 cm^{-1} e os estiramentos característicos da deformação axial C=C do anel aromático ocorre entre 1600-1460 cm^{-1} .

Figura 13. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier para a amostra de VE.



A banda de menor intensidade em 3030 cm^{-1} é atribuída aos estiramentos C-H aromática sp^2 características da sua deformação axial e a banda localizada em 2970-2869 cm^{-1} é característica dos estiramentos da deformação axial C-H assimétrica a CH_3 sp^3 e da deformação axial C-H assimétrica e simétrica a CH_2 . O grupamento éster da molécula de VE é identificado pela banda em 1670 cm^{-1} , característica do estiramento C=O da carbonila e em 1269 cm^{-1} característico do estiramento C-O. A deformação angular de C-H fora do plano da molécula é

dada pela banda presente em 813 cm^{-1} . A banda localizada em aproximadamente 2450 cm^{-1} é designada ao CO_2 atmosférico que estava presente no equipamento durante a medida realizada.

A caracterização física e química das NpAu foi realizada pela técnica de UV-visível. A caracterização estrutural e morfológica das NpSiO₂ foi realizada através das técnicas de FT-IR e MEV, a fim de se obter informações sobre a estrutura e o tamanho das NpSiO₂. Os pós de grafite, com e sem NpAu foram analisados através da espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS); microscopia eletrônica de varredura (MEV) espectroscopia Raman conforme a necessidade de investigação dos componentes do material compósito.

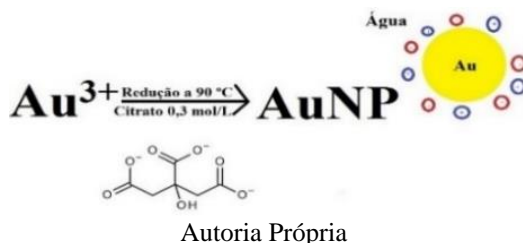
A partir das imagens de microscopia obtidas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi possível determinar o tamanho das partículas e identificar as suas diversas morfologias, assim como homogeneidade e rugosidade. A MEV também permitiu a realização da espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), esta técnica baseia-se na investigação de uma amostra levando em conta as interações entre as partículas ou a radiação eletromagnética e a matéria, analisando assim os raios X emitidos pela matéria em resposta à incidência do feixe eletrônico do microscópio.

Para a determinação do tamanho das NpAu foi-se utilizada a técnica de UV-Vís, através da observação das bandas Plasmon de absorção. Ao se aumentar o tamanho das Nps, observa-se na Figura 15 o aumento da absorbância deste espectro, o que está relacionado a aglomeração das NpAu em torno do núcleo de crescimento (Alvarez et al., 2018; Gorup et al., 2011). O Au^{3+} no início da reação tem a coloração amarelada. Após o início da redução do Au em solução pelos íons citrato e a fase de nucleação Au^0 a coloração amarelada desaparece por alguns segundos e as NpAu então passam a ter uma coloração azul. A coloração azul inicial é justificada pela redução do Au^{3+} pelo citrato indo do $+3$ para 0 , onde há um deslocamento hipsocrômico, ou seja, estas Nps estão com uma energia muito alta.

Ao decorrer da síntese há o aparecimento da coloração vermelha o que significa que as NpAu apresentam uma menor energia, ou seja, um deslocamento batocrômico dado para a região do vermelho (Alvarez et al., 2018; Gorup et al., 2011). A Figura 14 apresenta um esquema para redução dos íons Au^{+3} pelo íon citrato para a formação de Nps de Au^0 . Para este

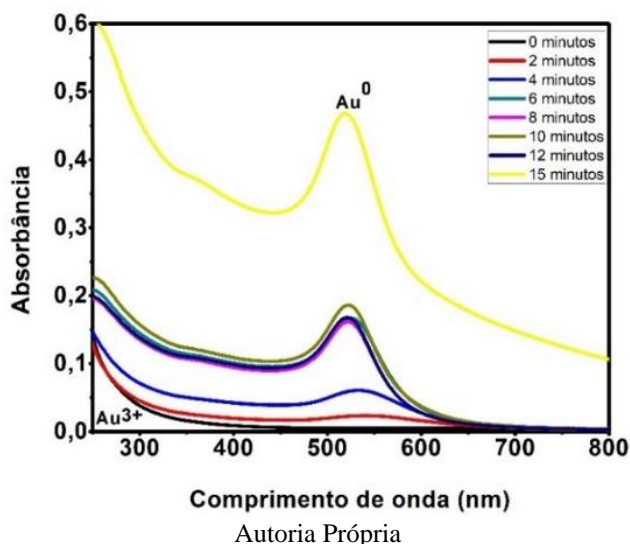
espectro (Fig. 15.), é possível observar que há um pequeno deslocamento hipsocrômico, onde as NpAu estão dadas num deslocamento com maior energia.

Figura 14. Esquema representativo da formação de Nps Coloidais de Ouro.



Foi possível obter as NpAu por meio do método de Turkevich (redução pelo citrato). Através da síntese foi obtida uma solução coloidal de coloração vermelha, corroborando com resultados encontrados na literatura, onde pode-se comprovar que a mesma apresentava uma alta estabilidade. Esta estabilidade está relacionada aos íons citrato adsorvidos à superfície das NpAu. A formação da solução coloidal está relacionada a reação de redução do Au^{+3} para Au^0 e os íons citrato funcionam como o agente redutor da reação, formando partículas de formato esférico. O tamanho das NpAu está relacionado a proporção de citrato de sódio no meio reacional e o tempo em que as Nps foram deixadas no meio reacional com aquecimento (Gorup et al., 2011).

Figura 15. Espectro de UV-Vis de Nanopartículas de Ouro em diferentes tempos de síntese.



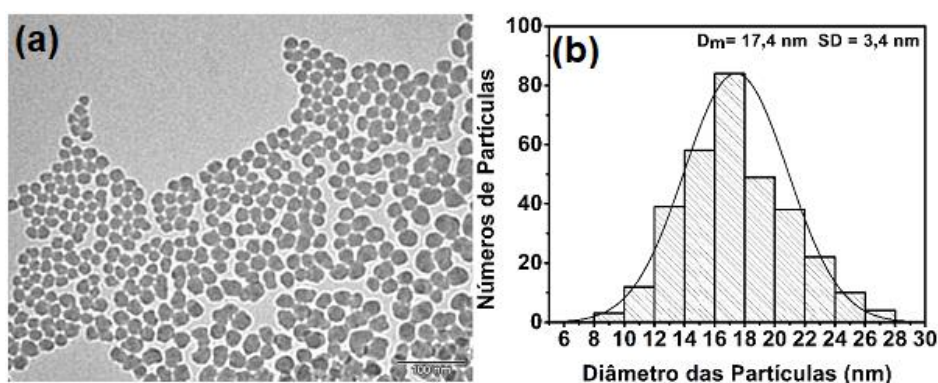
A Figura 15 apresenta os espectros de absorção na região UV-Vis para as diferentes alíquotas retiradas em diferentes tempos durante a síntese. A banda de absorção referente a Banda Plasmon. Os plasmons de superfície atrelados a formação das NpAu para as alíquotas

retiradas durante a síntese ocorrem por volta de 520 nm. De acordo com a literatura o valor de absorção encontrado no tempo de 15 min, quando se findou o aquecimento da solução coloidal, refere-se a Nps com diâmetro em torno de 15 nm (Gorup et al., 2011) . O comportamento observado para a absorção na região de 520 nm para todas as alíquotas é justificado pelo deslocamento das bandas de UV-Vis, relacionadas a um comprimento de onda mais estável para essas Nps.

Na síntese das NpSiO_2 pelo método de Stöber foram obtidas NpSiO_2 esféricas e monodispersas. Dependendo das proporções utilizadas do precursor TEOS e Amônia pode gerar Nps com tamanhos na ordem de nanômetros a micrometros representada na Figura 16 (a)-(b) (Arantes et al., 2012; Stöber et al., 1968). Para a medição do tamanho das Nps da amostra foi utilizado o Software ImageJ 1.52 (programa de domínio público utilizado para o processamento de imagens). Este programa é dado de forma multifuncional, ou seja, pode processar diversas imagens e operações a mesmo tempo em que as imagens devem estar descritas na mesma escala, para que o método seja mais confiável.

A imagem de MET para as NpSiO_2 e a distribuição do seu tamanho é representada na Figura 16 (a)-(b). Pode-se observar na Figura 16 (a) os aglomerados de NpSiO_2 devido a escala em 100 nm apresentada para a técnica de MET. A Figura 16 (b) apresenta a distribuição das médias de tamanho das NpSiO_2 . Verifica-se que a distribuição média das NpSiO_2 foi a de 17,4 nm \pm 3,4 nm, portanto comprovando que a síntese das Nps se deu de maneira controlada, gerando NpSiO_2 monodispersas e que estas poderiam ser adicionadas ao pó de grafite na proporção de 1%, produzindo assim o pó modificado para as análises eletroanalíticas (Arantes et al., 2012).

Figura 16. (a) MET e (b) Distribuição do tamanho de partícula para as NpSiO_2

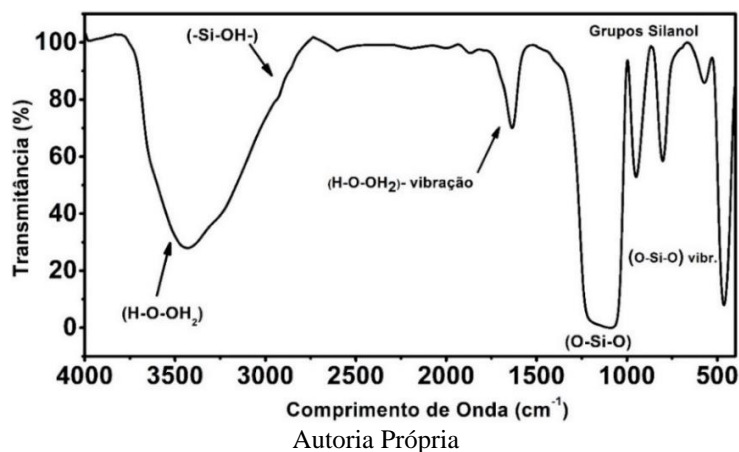


Autoria Própria

Em geral, a inserção de nanomateriais a matrizes em escala macroscópica seguem proporções baixas, para que não haja a mudança estrutural destes, apenas a incorporação da característica de interesse do nanomaterial. A proporção de inserção de materiais nanoparticulados a matrizes macroscópicas depende de qual aplicação quer se obter para o material compósito resultante, a proporção em 1% foi escolhida pois não há relatos de valores numéricos ou de análises quantitativas para a proporção de inserção de NpSiO_2 em EPC para a determinação eletroquímica. Ademais, quando há uma alta proporção dos materiais na composição do material compósito, estes podem reagir entre si e não haver uma distribuição heterogênea destes na matriz (Callister, 2002). A distribuição homogênea dos materiais na matriz do compósito não é adequada para a aplicação em questão, uma vez que a interação entre a NpSiO_2 e o pó de grafite dado de forma heterogênea agrega a característica da adsorção atrelada às NpSiO_2 .

O espectro de FT-IR apresentado na Figura 17 para as NpSiO_2 foi obtido a fim de demonstrar o comportamento da estrutura destas Nps e se havia algum tipo de contaminante neste composto. A Figura 17 mostra as bandas características para este composto. A banda localizada em aproximadamente 3440 cm^{-1} é designada ao estiramento da vibração das moléculas de H_2O . A banda em aproximadamente 1640 cm^{-1} é característica da flexão das moléculas de H_2O . A pequena deformação vista na banda característica para a água, em aproximadamente 3250 cm^{-1} , pode ser atribuída às vibrações do estiramento dos grupos Si-OH na estrutura de SiO_2 . A banda de alta intensidade localizada entre $1100\text{-}1010\text{ cm}^{-1}$ é atribuída os grupos siloxanos (Si-O-Si) e em aproximadamente 960 cm^{-1} está relacionada ao estiramento -OH dos grupos silanóis, também é possível observar uma banda de alta intensidade localizada em aproximadamente 480 cm^{-1} está associada à vibração angular O-Si-O das moléculas de SiO_2 (Arantes et al., 2012).

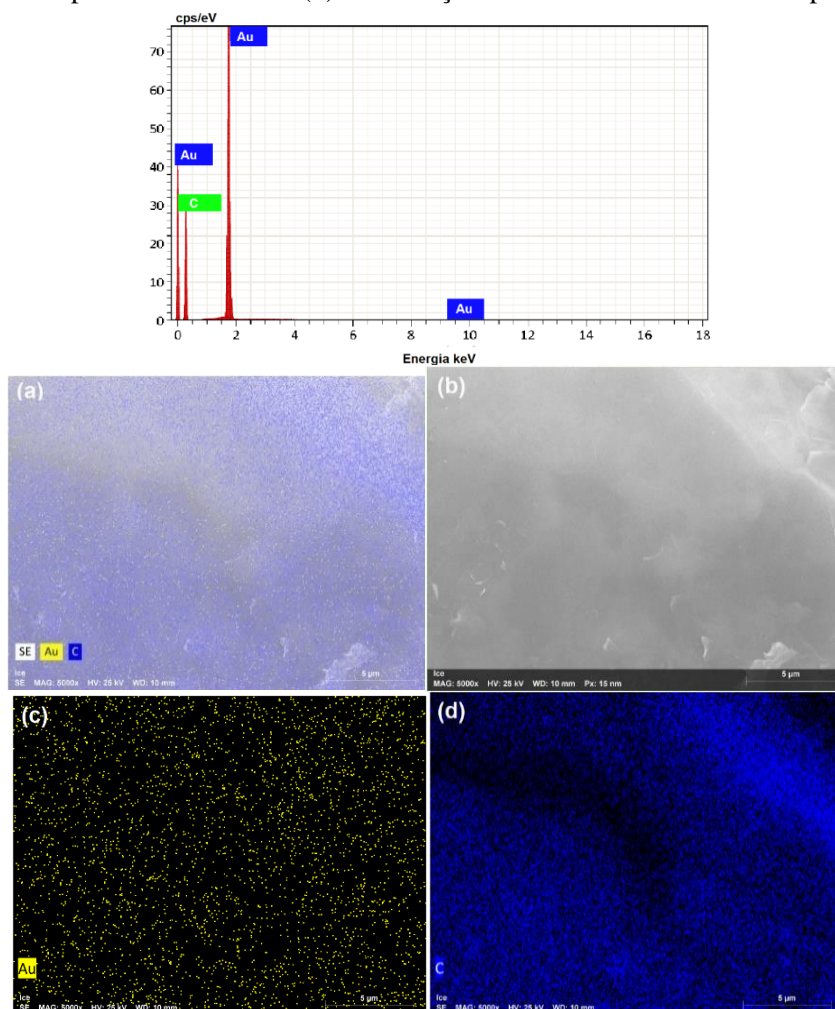
Figura 17. Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier para a amostra de NpSiO_2 .



A Espectroscopia de EDS foi realizada a fim de caracterizar a composição dos pós de Grafite com e sem modificação de NpAu. O espectro de EDS apresentado na Figura 18 (a)-(d) confirma a presença de ouro na amostra de pó de grafite (PG) contendo NpAu com porcentagem de massa de 0,07%. Na Figura 18(a) é possível observar a distribuição dos átomos de C e Au na composição da amostra de pó de grafite com NpAu, pode-se observar uma distribuição uniforme na composição do material nanocompósito. Na

Figura 18 (b) há o imageamento de EDS para a amostra de PG/NpAu, não há a apresentação de nenhum granulo anômalo ao PG para este imageamento. Na Figura 18 (c) é possível notar que no PG as NpAu estão dispersas de maneira uniforme sendo assim para o preparo da pasta de carbono um resultado positivo. A Figura 18 (d) apresenta a distribuição dos átomos de C para o PG, sendo este dado de forma uniforme.

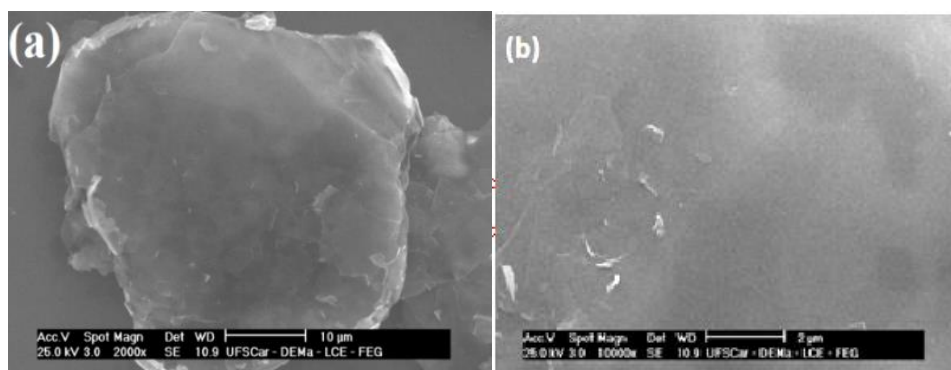
Figura 18. Espectro de EDS para amostra de pó com NpAu (a) distribuição dos átomos de carbono e de ouro na amostra; (b) imageamento EDS para pó contendo nanopartículas de ouro; (c) distribuição de átomos de ouro na superfície da amostra (d) distribuição de átomos de carbono na superfície da amostra



Autoria Própria

A Figura 19 (a)-(b) apresenta as MEVs dos pó com e sem NpAu, realizadas para a mesma amostra submetida ao EDS. A distribuição uniforme das NpAu sobre o pó de grafite pode ser confirmada pelas imageamento de EDS da Figura 18 (c). A Figura 19(a) apresenta o pó de grafite sem nenhum modificador e a Figura 19 (b) apresenta o pó de grafite contendo as NpAu, comprovando que como a escala é muito grande não há a visualização das NpAu, uma vez que o tamanho de uma nanopartícula é 1000 vezes menor do que o tamanho dos flocos de grafite. Para as NpSiO₂ não foi possível a realização das medidas de EDS e MEV, uma vez que a sua escala também não permitiria a visualização do componente na amostra.

Figura 19. MEV para (a) Pó de grafite modificador; (b) pó de grafite com NpAu.



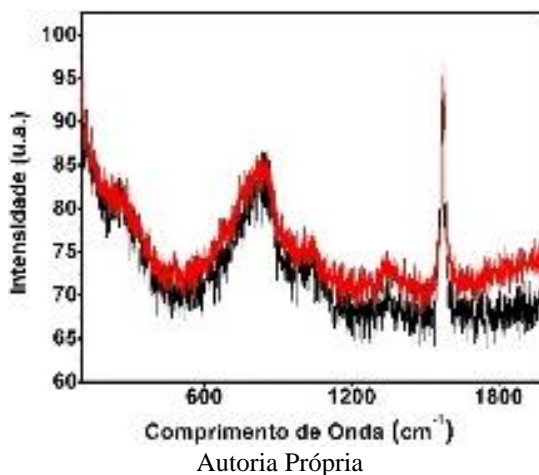
Autoria Própria

A Figura 20 apresenta o espectro Raman para os pó modificados NpAu (em vermelho) e o pó de grafite sem nenhuma modificação (em preto). Foi possível observar que houve um aumento da intensidade do espectro para o pó modificado com NpAu. A presença das NpAu como modificador no pó de grafite pode melhorar consideravelmente a corrente do método proposto neste trabalho, pois o ouro em escala nanométrica apresenta uma maior taxa de transferência de elétrons, ajudando no processo de reconhecimento na superfície da interação interface/solução.

A presença das NpAu no material eletrodico promove uma maior área superficial para o eletrodo, melhorando o transporte de massa/carga dos íons em solução (Gama & Oliveira, 2016). As NpAu possibilitam que as reações de oxirredução na superfície do eletrodo se deem de maneira mais rápida. A presença das NpSiO₂ para este trabalho foi sugerida pois a mesma apresenta uma capacidade de adsorção alta, sendo assim, melhoraria a adsorção do analito na superfície do eletrodo. Para técnicas eletroanalíticas, como já citado anteriormente, a corrente

de oxidação está relacionada a concentração do analito na superfície do eletrodo, o que justifica o uso das NpSiO₂ para a confecção de um EPC.

Figura 20. Espectro Raman para amostras de pó de grafite contendo (—) Grafite puro; (—) Nanopartículas de Ouro

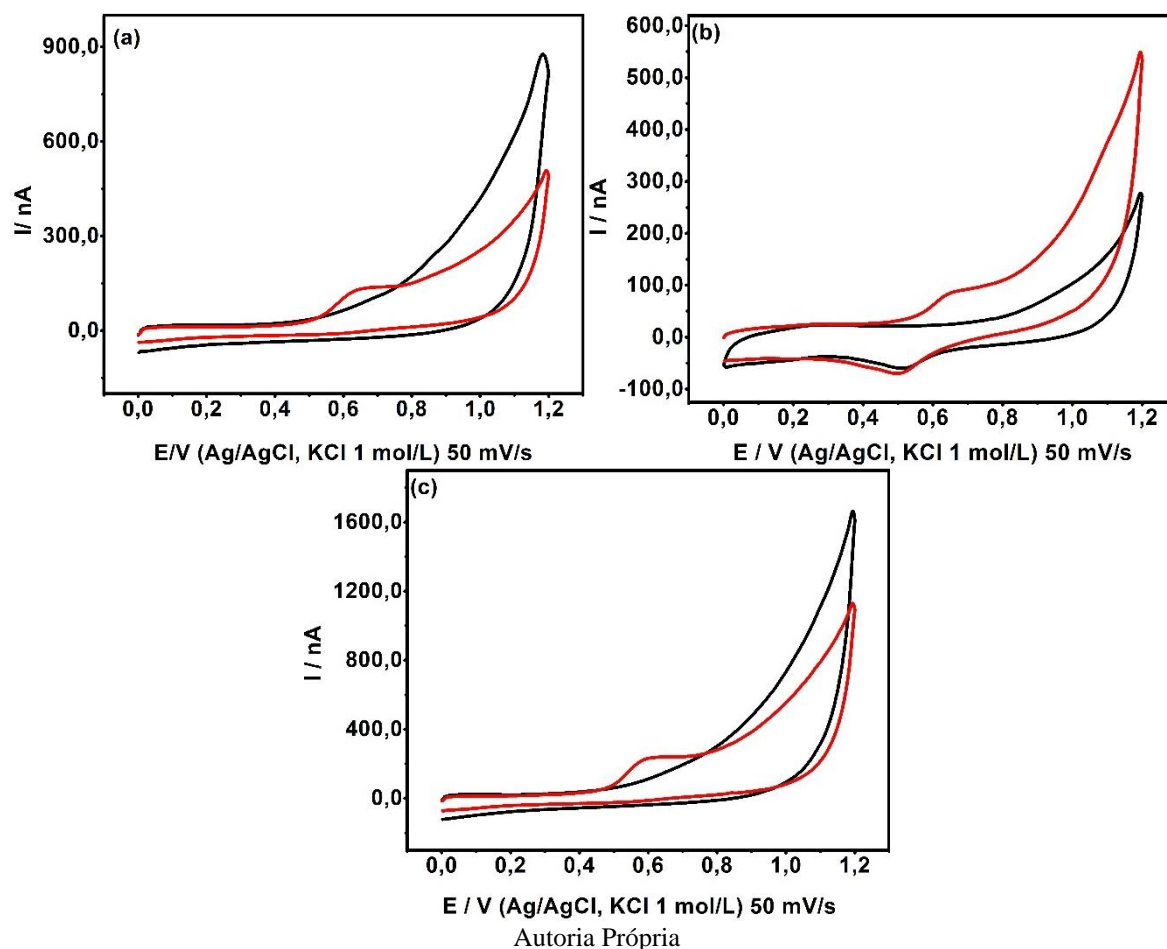


Autoria Própria

5.2. Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos de Trabalho

O comportamento eletroquímico do VE sobre a superfície dos eletrodos de pasta de carbono modificados foi avaliado utilizando as técnicas de VC e DPV. O experimento para a VC foi realizado na ausência e na presença de VE 1×10^{-4} mol/L em PBS 0,100 mol/L (pH 7,0). As medidas eletroquímicas foram realizadas com o controle da temperatura do ambiente e com o controle da luz incidente na célula eletroquímica, uma vez que estes são fatores que afetam as análises. A Figura 21 (a)-(c) apresenta os voltamogramas cíclicos para os eletrodos de pasta de carbono modificada por NpAu ou NpSiO₂ e para o EPC sem modificação nas soluções eletrolíticas com e sem a presença de VE, afim de obter o comportamento eletroquímico desta substância quando aplicado uma janela de potencial. Para a curva voltamétrica apresentada em preto, contendo apenas a solução de PBS não foi observado nenhum pico de oxidação e redução para os eletrodos sem modificação e NpSiO₂ nas Figuras 21 (a) e (c). Para o eletrodo modificado com a NpAu Figura 21 (b) um pico de redução foi observado em potencial de redução +0,500 V em solução de PBS (branco). Este potencial pode estar relacionado a redução do ouro, isso se deve ao fato de que a solução coloidal de ouro, mesmo após a lavagem não é possível a retirada dos íons Au³⁺ na solução, sendo assim, após o preparo do pó de grafite, estes ficam disponíveis na superfície do eletrodo. Outra explicação para o aparecimento deste pico deve-se ao fato de que para potenciais mais positivos que +0,800 V na varredura direta o ouro sofre oxidação e quando há a varredura inversa no sistema reversível, o ouro sofre a redução, gerando então o pico característico em +0,500 V na varredura inversa.

Figura 21. VC em 50 mV/s com janela de potencial entre +0,000 a +1,200 V, velocidade de varredura de 50 mV/s, a voltametria deu-se em 1 ciclo (Ag/AgCl, KCl 1 mol/L) para a solução eletrolítica com (—) e sem (—) Valerato de Estradiol para os eletrodos de (a) sem modificador, (b) NpAu, (c) NpSiO₂

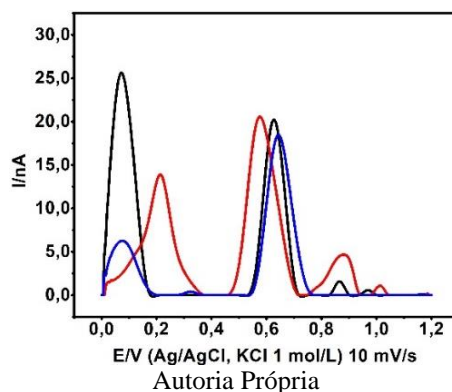


Na Figura 21 (a)-(c), na curva em vermelho, o VE apresenta um único processo de oxidação em aproximadamente +0,600 V para os eletrodos de pasta de carbono sem modificação e o eletrodo de NpSiO₂ e nenhum processo de redução. Este resultado corrobora com a literatura (Chen et al., 2018; Cincotto et al., 2014a; Janegitz et al., 2014; Lahcen et al., 2017; Moraes et al., 2015; Sacht et al., 2016), pois estes eletrodos apresentam a oxidação irreversível do grupo hidroxila presente no anel aromático da molécula do VE. A oxidação do VE gera uma espécie de cetona como produto (Cincotto & Machado, 2017; Janegitz et al., 2014; Moraes et al., 2015). Para o voltamograma do eletrodo de NpAu apresentado na Figura 21 (b), na curva em vermelho, o processo de oxidação do VE também foi observado, mas este também apresenta um pico de redução, de forma análoga ao processo apresentado no voltamograma para o eletrólito PBS. O eletrodo de NpAu não apresentava nenhum pico de oxidação na varredura direta na medida apenas com PBS mesmo após a repetição dos ciclos no eletrodo.

Foi possível constatar que esse poderia ser usado também para a detecção de VE na solução eletrolítica.

Na Figura 22 são exibidos os voltamogramas de DPV relacionados a eletro-oxidação do VE, utilizando-se os eletrodos de pasta de carbono com e sem modificação, as medidas foram realizadas na solução eletrolítica de 1×10^{-4} mol/L de VE em 0,100 mol/L PBS (pH 7,0). Foi possível observar que o EPC contendo NpAu, apresentado (curva em vermelho), quando em comparação aos demais eletrodos NpSiO₂ (curva em azul) e sem modificação (curva em preto), desloca o potencial para a identificação do VE para o potencial em +0,600 V. Os eletrodos de pasta de carbono sem modificação (curva em preto) e contendo NpSiO₂ (curva em azul) deslocam o potencial para potenciais mais positivos que +0,600 V.

Figura 22. DPV janela de potencial entre +0,000 a +1,200 V, com amplitude de pulso de 50 mV e passo de potencial de 5 mV e velocidade de varredura em 10 mV/s (Ag/AgCl, KCl 1 mol/L) para os eletrodos (—) sem modificador, (—) NpSiO₂, (—) NpAu



Este resultado corrobora com a premissa de que eletrodos com diferentes composições podem afetar a medida e a detecção de analitos. A superfície do eletrodo é composta de diferentes materiais que podem ter maior afinidade aos grupos presentes no analito do que outros. Este fator não inviabiliza as medidas eletroanalíticas ele apenas muda o referencial para o mesmo. Cincotto et al. ao utilizar eletrodos de carbono vítreo modificado com Nps de sulfeto de Cadmio e Telúrio na presença de óxido de Grafeno, observou que o potencial de oxidação do VE foi dado em +0,550 V, corroborando com a hipótese da mudança do potencial para tipos diferentes de superfície sensora (Chen et al., 2018; Cincotto et al., 2014a; Cincotto & Machado, 2017; Janegitz et al., 2014; Lahcen et al., 2017; Martinez et al., 2017; Moraes et al., 2015).

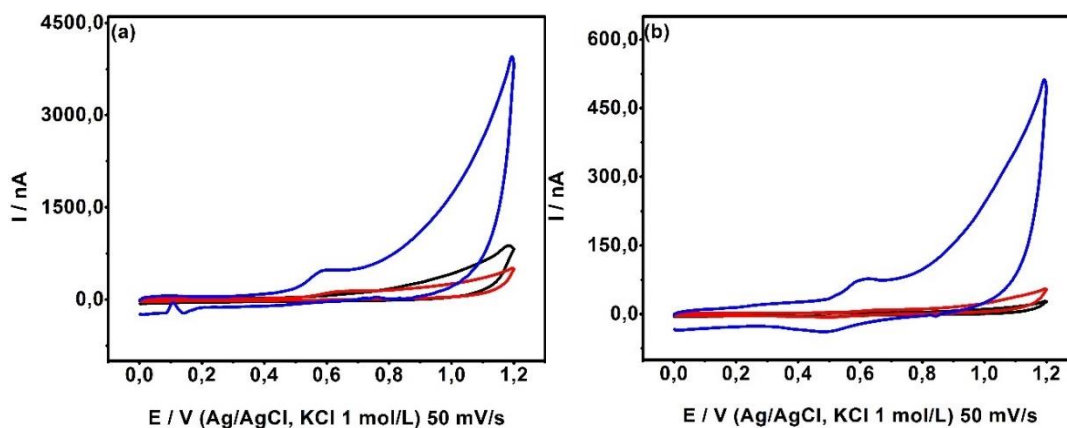
O VE possui a característica da lipossolubilidade. Esta característica está relacionada a sua cadeia carbônica aromática apolar. A cadeia carbônica apresenta o sítio com a terminação -OH ligada ao anel aromático. Mesmo que este tipo de estrutura que gera um pequeno caráter polar na molécula, esta polaridade não é o suficiente para que esta seja solúvel em água

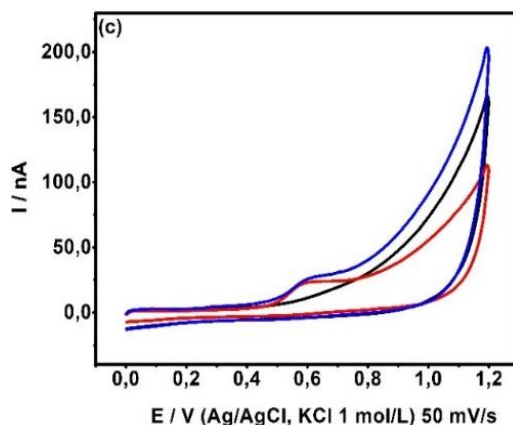
(Machado et al., 2010). De acordo com a literatura consultada para a realização deste trabalho, o VE apresenta uma considerável taxa de solubilidade em soluções com pH levemente ácido e em pH próximo a 7,00. Este comportamento é comprovado pela detecção deste analito em amostras de Urina que apresenta uma variação de pH para pacientes saudáveis de 5,75 a 7,5 de acordo com os diretórios de saúde (Simerville et al., 2005).

Quando se trata de compostos com baixa solubilidade em água o uso de surfactantes aniônicos como o Dodecil Sulfato de Sódio é de grande interesse. Os surfactantes têm a capacidade de se ligar a moléculas com caráter hidrofóbico com fazendo com que estas se tornem parcialmente solúveis em água. A presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na estrutura dos surfactantes faz com que estes tendam a se distribuir nas interfaces de soluções com diferentes graus de polaridade. Esta distribuição auxilia na formação de um filme molecular nas interfaces desta solução, o que reduz a tensão interfacial e superficial da mesma. Estas características permitem então que os surfactantes possam ser utilizados para aplicações nas áreas industriais como: detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização, dispersão de fases e também em experimentos eletroquímicos (Maniasso, 2001; Nitschke & Pastore, 2002; B. Oliveira & Bertazzoli, 2007; Rizzatti et al., 2009).

As Figuras 23 (a-c) apresentam os voltamogramas cíclicos obtidos para os EPCs com e sem modificação nas soluções com e sem SDS. É possível observar na Figura 23 (a-c) que houve o aumento na resposta da corrente de pico para oxidação VE na presença do SDS, este aumento pode estar associado à interação surfactante/eletrodo, uma vez que esta contribui para minimizar ou suprimir a passivação da superfície eletródica e também como auxiliar na transferência de carga do analito na superfície modificada pelo surfactante.

Figura 23. Voltamogramas cíclicos em PBS (pH 7,0) (—) branco; (—) 17- β -estradiol; (—) SDS/Valerato de Estradiol para (a) eletrodo sem modificação; (b) NpAu; (c) NpSiO₂





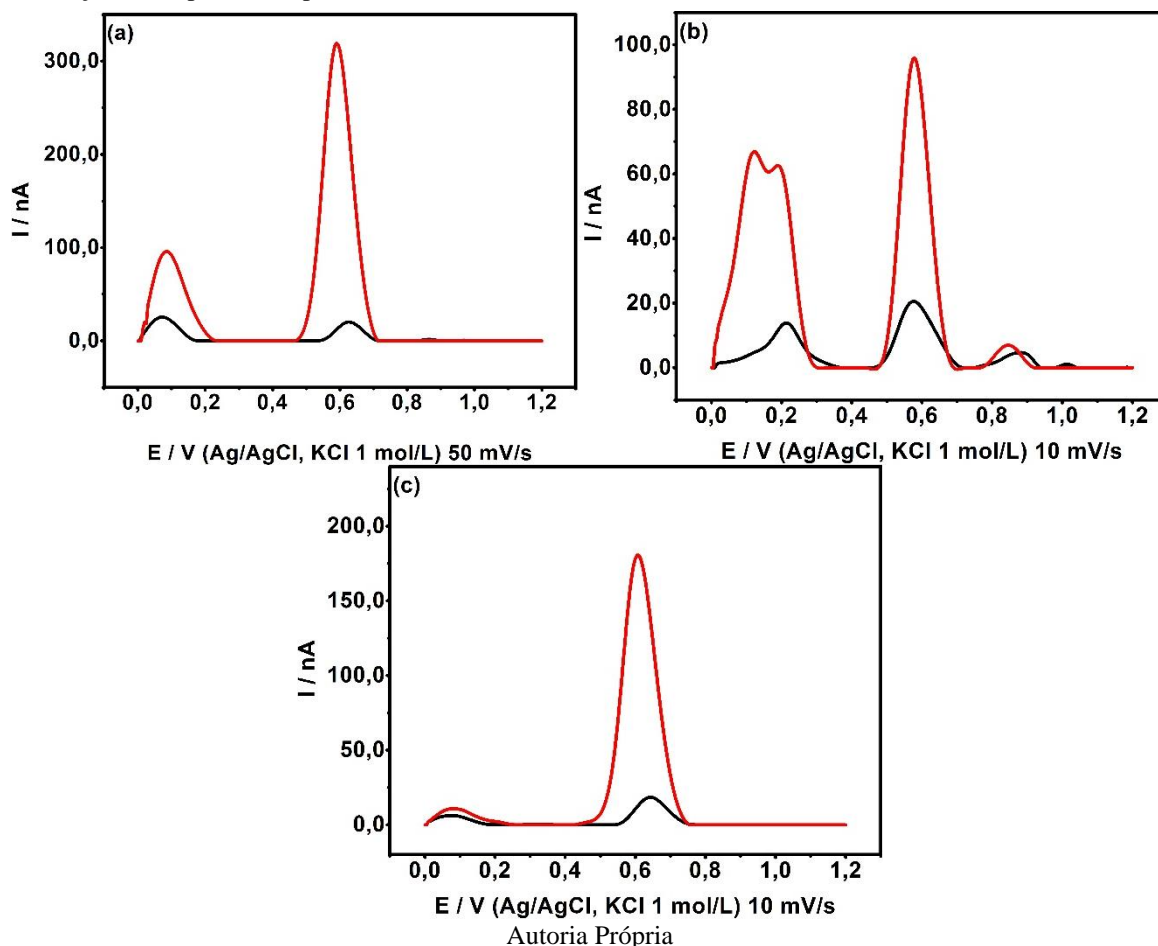
Autoria Própria

O uso de surfactantes é de grande interesse para a área dos estudos eletroquímicos, uma vez que estes podem minimizar ou suprimir a passivação da superfície eletródica. Esta passivação pode ser ocasionada pela adsorção dos produtos gerados na solução após a aplicação de um potencial de oxirredução. O uso dos surfactantes também tem sido estudado pois estes podem minimizar os problemas advindos de matrizes complexas, como é o caso da determinação em amostras de Urina Humana. Os interferentes presentes nestas amostras podem adsorver-se de maneira irreversível na superfície do eletrodo de trabalho, fazendo com que esta fique inativa de forma parcial ou total (Bergamini et al., 2005; Bilibio & Trindade, 2014; Maniasso, 2001; Rizzatti et al., 2009). Os surfactantes podem adsorver-se de forma espontânea na superfície do eletrodo de trabalho, essa adsorção se dá por meio das interações hidrofóbicas, que formam uma camada adsorvida de surfactante adjacente à superfície eletródica (Maniasso, 2001; B. Oliveira & Bertazzoli, 2007; Rizzatti et al., 2009). A adsorção do surfactante nesta superfície pode contribuir para a melhoria do reconhecimento do analito, uma vez que a superfície modificada pela formação do filme de surfactante pode minimizar problemas de adsorção irreversível do produto do processo de oxirredução. Este fenômeno gera a melhoria na velocidade de transferência de elétrons, e também a diminuição do sobrepotencial que é necessário para que ocorra à reação eletroquímica (Bilibio & Trindade, 2014; Maniasso, 2001; Nitschke & Pastore, 2002; Rizzatti et al., 2009).

O uso de uma solução sintética que mimetiza o pH da urina foi necessário para as medidas da obtenção da curva de calibração. O comportamento da solução eletrolítica contendo o surfactante SDS foi estudado para averiguar se a presença deste surfactante não produzia nenhum pico de redução ou oxidação que intervisse na detecção do VE. Foram realizadas as medidas de VC e DPV com a concentração de SDS em 1×10^{-3} mol/L, ajustando-se o volume

da solução de VE para que este fosse dado de maneira fiel a solução sem a presença do surfactante SDS para todos os eletrodos estudados neste trabalho.

Figura 24. Voltamogramas DPV (—) PBS/17- β -estradiol; (—) SDS/17- β -estradiol; (a) eletrodo sem modificação; (b) NpAu; (c) NpSiO₂

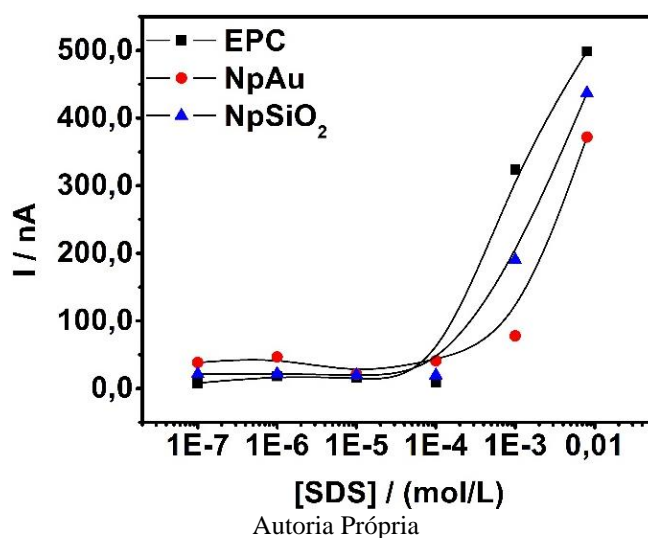


As Figuras (a)-(c) mostra o perfil da DPV para cada eletrodo para a solução de SDS 1×10^{-3} mol/L. É possível evidenciar que a presença do surfactante na solução de PBS/U.S./1VE, tanto na VC (Figura 23) quanto na DPV (Figura 24), não interfere no perfil de oxirredução do VE, mas sim influencia no aumento da corrente de pico relacionada ao VE na medida eletroanalítica. Este fato está atrelado ao fato de que o SDS afeta a cinética de oxidação do VE (Bilibio & Trindade, 2014; Maniasso, 2001; Nitschke & Pastore, 2002; Rizzatti et al., 2009).

A investigação da concentração de SDS para as medidas eletroanalíticas foi de grande importância, a fim de obter a maior razão sinal/ruído para a detecção do VE na solução. A curva de concentração de SDS apresentada na Figura 25 foi dada entre 1×10^{-7} a 1×10^{-3} mol/L e na CMC padrão do SDS (8 mmol/L), tanto para a DPV. O melhor resultado para esta curva foi obtido para a concentração de 1×10^{-3} mol/L de SDS.

O aumento da concentração do surfactante SDS na célula eletroquímica promoveu um aumento significativo na intensidade da corrente de pico para o VE. Quando o surfactante é utilizado abaixo da concentração micelar crítica (CMC), o mesmo encontra-se como monômero e a interação que ocorre entre o analito/surfactante pode ser predominantemente eletrostática (Bilibio & Trindade, 2014; Maniasso, 2001; Rizzatti et al., 2009). Contudo, devido ao fato de que há uma grande quantidade de íons de carga oposta, provenientes da solução eletrolítica complexa de U.S., estes se tornam parte das micelas formadas. Sendo assim, pode ocorrer o aumento no número de espécies disponíveis para o transporte de corrente elétrica, bem como na carga total dos agregados “micelares” para interação da superfície eletródica com o analito de interesse.

Figura 25. Curva de Calibração para o SDS I/nA vs. [SDS]/ mol/L.



Quando se trata da eletroquímica, os processos necessários para a melhor visualização de uma análise são aqueles que ocorrem na interface eletrodo/solução, sendo estes diferenciados do material em escala macroscópica, portanto o uso da solução de SDS abaixo da CMC é explicado. O uso do SDS na CMC não seria justificado, uma vez que quando há a formação de micelas estas podem carrear o analito, tornando-os indisponíveis na camada difusa da solução, diminuindo, portanto, o sinal analítico observável para o fenômeno da oxidação do analito de interesse, sendo neste trabalho o VE. Outro fator decisivo para a escolha da concentração de SDS em 1×10^{-3} mol/L é o de que a repetibilidade ($n=6$) entre as correntes de pico foi significativamente melhor durante as medidas obtidas na concentração de 1 mmol/L de SDS quando em comparação às encontradas na CMC. Por isso, a concentração de 1 mmol/L de SDS

foi a selecionada para o andamento das medidas eletroquímicas, por esta apresentar a magnitude de sinal analítico satisfatório e alta repetibilidade das medidas.

Após a investigação das concentrações de SDS e como estas influenciavam a razão sinal/ruído para a corrente de oxidação do VE, foi elaborado o planejamento fatorial para os parâmetros da DPV, a fim de melhorar a razão sinal/ruído da corrente de pico de oxidação para o VE. O planejamento fatorial foi dado de acordos com as Tabelas 1 e 2 demonstradas no procedimento experimental. A Tabela 3 apresenta os valores de efeito sobre o sinal/ruído dos 8 ensaios provenientes do planejamento fatorial 2^{5-2} para as soluções eletrolíticas com e sem SDS em 1×10^{-4} mol/L de 17- β -estradiol. As condições escolhidas para as análises da obtenção da curva de calibração foram dadas nas condições do planejamento fatorial em que se observasse o maior sinal-ruído para cada eletrodo.

Tabela 3. Valores de Efeito sobre Sinal/Ruído do planejamento fatorial 2^{5-2}

Ensaio	Sem SDS			Com SDS		
	S/R branco	S/R NpAu	S/R NpSiO ₂	S/R branco	S/R NpAu	S/R NpSiO ₂
1	59,5	26,4	18,5	15,9	22,8	12,0
2	28,6	25,5	17,8	26,4	0,0	16,1
3	17,9	19,5	20,2	20,9	20,3	13,2
4	22,8	18,4	24,4	25,1	22,9	13,0
5	29,3	24,6	29,2	22,4	21,2	19,4
6	14,8	23,4	18,9	18,0	11,1	15,1
7	24,4	21,1	23,0	34,4	21,3	31,9
8	29,0	24,9	21,5	36,9	17,5	18,5

Através do planejamento fatorial e dos valores de efeito sobre o sinal ruído dos 8 ensaios, as condições escolhidas sem SDS para as medidas de DPV foram 1 para os eletrodos sem modificador e NpAu e a condição 5 para o eletrodo de NpSiO₂. As condições escolhidas para a solução 1×10^{-3} mol/L SDS, para os eletrodos foram 8, 4 e 7, para Epc, NpAu e NpSiO₂ respectivamente.

5.3. Curva de Calibração para o Valerato de Estradiol

A curva de calibração para a determinação do Limite de Quantificação (LQ) e o Limite de Detecção (LD) do método proposto pelo trabalho apresentado, foi dado nas concentrações variando de 1×10^{-6} a $3,04 \times 10^{-4}$ mol/L. Seguindo as condições do planejamento fatorial onde se obteve a maior razão sinal/ruído para as soluções eletrolíticas sem e com SDS 1×10^{-3} mol/L. Para isto foram realizadas medidas na solução eletrolítica de Urina Sintética/PBS com e sem

SDS e sem a presença de VE. Isto foi feito a fim de obter os valores de corrente no potencial de oxidação característico para o VE confirmando que nenhuma das soluções interferiria na identificação deste, uma vez que os valores de corrente encontrados foram menores do que 1×10^{-10} A.

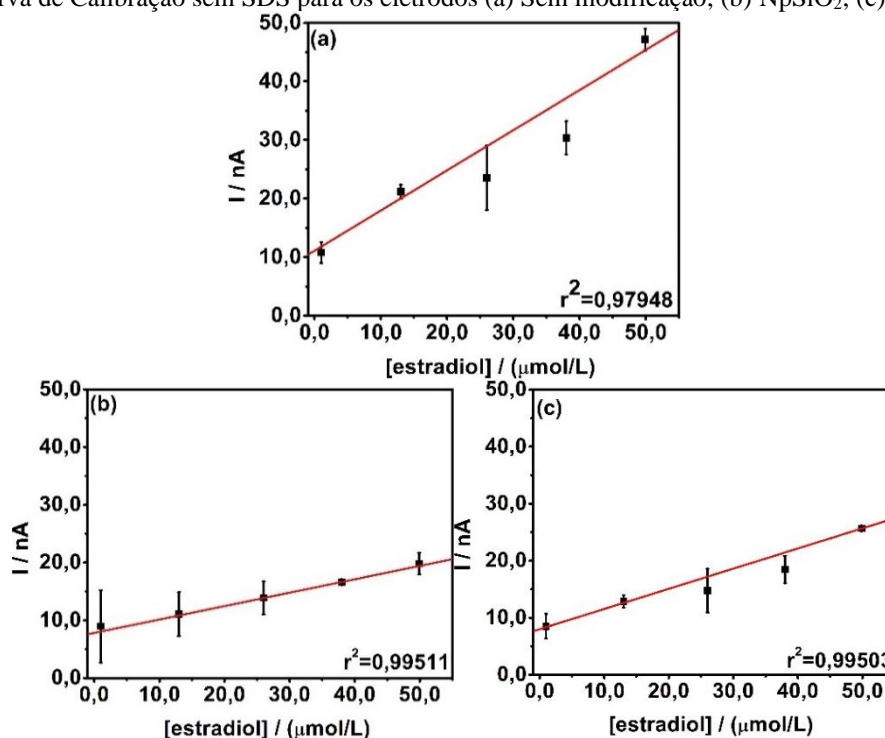
Todo o método de análise química possui um limite de detecção (LD) e um limite de quantificação (LQ). Esses limites mostram que toda técnica de identificação de substâncias tem um limite abaixo do qual não se pode detectar o analito procurado. Sendo assim, o cálculo para LD e LQ de um método de identificação pode ser dado por:

$$LD = 3,3 * \frac{s.d.}{a} \quad (1) \quad LQ = 10 * \frac{s.d.}{a} \quad (2)$$

Para 1 e 2: s.d. (standard deviation) o desvio padrão do branco, a é a inclinação da reta ou coeficiente angular da curva analítica.

A Figura 26 (a)-(c) apresenta os gráficos para a curva de calibração sem a presença de SDS, onde os valores para o desvio padrão são representados no gráfico na forma da barra de erro vertical para cada um dos eletrodos. Ao se obter a regressão linear das retas foi possível fazer o cálculo para o LD e LQ para cada eletrodo em suas respectivas curvas. Foi verificado para o EPC sem modificação na Figura 26 (a) uma relação linear (coeficiente angular de 685 mA/mmol, coeficiente linear $1,10 \times 10^{-11}$ e coeficiente de determinação r^2 0,97948. Foi verificado para o EPC com NpAu na Figura 26 (b) uma relação linear (coeficiente angular de 232 mA/mmol, coeficiente linear $7,81 \times 10^{-9}$ e coeficiente de determinação r^2 0,99511. Foi verificado para o EPC com NpSiO₂ na Figura 26 (c) uma relação linear (coeficiente angular de 353 μ A/mmol, coeficiente linear $8,00 \times 10^{-9}$ e coeficiente de determinação r^2 0,99503).

O LD e o LQ sem a presença de SDS na solução dados para o método proposto desenvolvido neste trabalho estão apresentados na Tabela 4. É possível observar que na presença dos nanomateriais o LD e o LQ são diferenciados daquele observado para o EPC sem modificação. Dentre os eletrodos estudados para a solução sem a adição de SDS é importante salientar que o EPC que continha as NpSiO₂ apresentava os melhores LD e LQ, onde estes corroboram com aqueles definidos pela ANA.

Figura 26. Curva de Calibração sem SDS para os eletrodos (a) Sem modificação; (b) NpSiO₂; (c) NpAu.

Autoria Própria

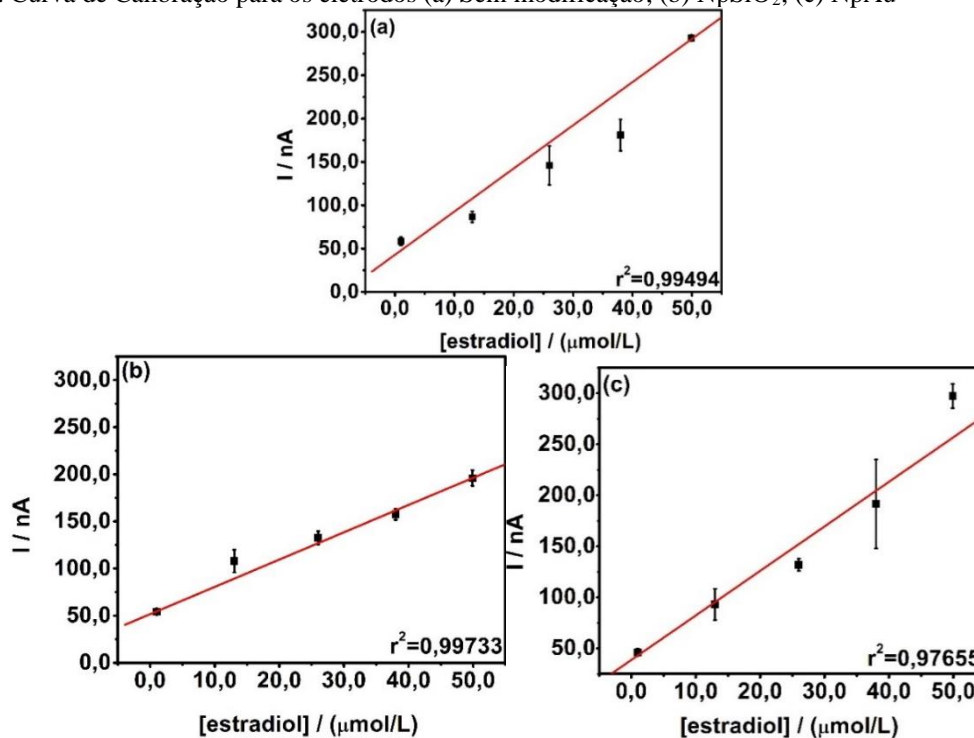
Tabela 4 Valores de LD e LQ para o Valerato de Estradiol na solução sem SDS

Solução	Sem SDS	
	LD ($\mu mol/L$)	LQ ($\mu mol/L$)
Sem modificador	0,397	1,2
NpAu	0,179	0,542
NpSiO ₂	1,3	3,95

A Figura 27 (a)-(c) apresenta os gráficos para a curva de calibração com a presença de SDS, onde os valores para o desvio padrão são representados no gráfico na forma da barra de erro vertical para cada um dos eletrodos. Ao se obter o fit linear das retas foi possível fazer o cálculo para o LD e LQ para cada eletrodo em suas respectivas curvas. A Figura 27 (a)-(c) apresenta as curvas de calibração para os eletrodos investigados neste trabalho. Foi verificado para o EPC sem modificação na Figura 27 (a) uma relação linear (coeficiente angular de 0,00498 A/mmol, coeficiente linear $4,30 \times 10^{-8}$ e coeficiente de determinação r^2 0,99494). Foi verificado para o EPC com NpAu na Figura 27 (b) uma relação linear (coeficiente angular de 0,00289 A/mmol, coeficiente linear $5,17 \times 10^{-8}$ e coeficiente de determinação r^2 0,99733). Foi

verificado para o EPC com NpSiO₂ na Figura 27 (c) uma relação linear (coeficiente angular de 0,00436 A/mmol, coeficiente linear $3,86 \times 10^{-8}$ e coeficiente de determinação r^2 0,97655).

Figura 27. Curva de Calibração para os eletrodos (a) Sem modificação; (b) NpSiO₂; (c) NpAu



Autoria Própria

O LD e o LQ na presença de SDS na solução dados para o método proposto desenvolvido neste trabalho estão apresentados na Tabela 5. É possível observar que na presença dos nanomateriais o LD e o LQ, na presença desse surfactante aniônico, diminuíram consideravelmente, quando em comparação ao EPC sem modificação. Dentre os eletrodos estudados para a solução com a adição de SDS, foi possível observar de forma análoga à solução sem SDS que o EPC que continha as NpSiO₂ apresentava os melhores LD e LQ.

Tabela 5 Valores de LD e LQ para o Valerato de Estradiol na solução com SDS 1,00 mmol/L

Solução	Com SDS	
	LD ($\mu\text{mol/L}$)	LQ ($\mu\text{mol/L}$)
Sem modificador	0,0975	0,297
NpAu	0,299	0,905
NpSiO ₂	0,0186	0,0563

Tabela 6. Trabalhos utilizando eletrodos modificados para determinação de estrogênios e seus respectivos LD.

Eletrodo	LD ($\mu\text{mol/L}$)	Trabalho relatado
----------	--------------------------	-------------------

GCE ¹ modificado com filme de PP ² e OMC ³	0,005	(Luo et al., 2013)
GCE modificado com rGO ⁴ e película de DHP ⁵	0,077	(Janegitz et al., 2014)
GCE modificado com rGO e um complexo metálico de porfirina	0,005	(Moraes et al., 2015)
EPC ⁶ modificado com GR ⁷ e OMC	0,002	(Zhu et al., 2015)
SPCE ⁸ modificado com polímero magnético e NPs ⁹ Fe ₃ O ₄ ⁹	0,020	(Lahcen et al., 2017)
GCE modificado com Fe ₃ O ₄ -NC ¹⁰	0,0049	(Chen et al., 2018)
PC ¹² /NPs Fe ₃ O ₄ -BML.PF ₆ ¹¹	0,045	(Moreira et al., 2018)
EPC	0,0975	
EPC/NpAu ¹³	0,299	Este Trabalho
EPC/NpSiO ₂ ¹⁴	0,0186	

¹GCE: eletrodo de carbono vítreo, ²PP: poli (L-prolina), ³OMC: carbono mesoporoso, ⁴rGO: óxido de grafeno reduzido, ⁵DHP: dihexadecilfosfato, ⁶EPC: eletrodo de pasta de carbono, ⁷GR: grafeno, ⁸SPCE: eletrodo de carbono impresso, ⁹NPs de Fe₃O₄: Nanopartículas de óxido de ferro, ¹⁰NC: carbono nanoporoso, ¹¹BML.PF₆: 1-butil-3-metilimidazólio, ¹²PC: pasta de carbono, ¹³NpAu: Nanopartículas de Ouro, ¹⁴NpSiO₂: Nanopartículas de óxido de Silício.

A Tabela 6 apresenta diferentes trabalhos utilizando eletrodos modificados encontrados na literatura para a determinação de VE. Com este resultado, é possível reafirmar que o EPC/NpAu e EPC/NpSiO₂ são muito mais sensíveis para análise de VE que o EPC não modificado estudados neste trabalho. Tendo-se o melhor LD e LQ quando se tratava do EPC/NpSiO₂. Os EPCs com e sem modificação apresentado neste trabalho apresenta os valores de LD e LQ acima do valor máximo de detecção de VE, porém quando comparado a eletrodos obtidos por outros tipos de modificadores, os eletrodos propostos neste trabalho apresentam etapas mais fáceis de processamento, sem a adição de etapas complexas para a sua obtenção. Sendo assim, o método proposto neste trabalho pelos EPCs modificados é promissor para a detecção de VE.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram preparados os eletrodos modificados de pasta de carbono (EPC) com a inserção de NpAu com 15 nm de tamanho; e de NpSiO₂ com $17,4 \pm 3,4$ nm de tamanho para detecção eletroanalítica do VE. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que estes eletrodos podem ser utilizados para a construção de biossensores para o hormônio 17- β -estradiol sem que haja a necessidade da incorporação de marcadores de difícil acesso e ou processos com maior custo agregado para a obtenção da superfície sensora.

Pode-se observar que a inserção das Np na pasta de carbono melhorou significativamente os parâmetros analíticos de limite de detecção. Para os eletrodos de pasta de carbono na solução sem SDS: sem modificação, NpAu e NpSiO₂, 0,397 $\mu\text{mol/L}$ (142 $\mu\text{g/L}$); 0,179 $\mu\text{mol/L}$ (63,8 $\mu\text{g/L}$) e 1,30 $\mu\text{mol/L}$ (463 $\mu\text{g/L}$), respectivamente. Para o limite de quantificação dos eletrodos na solução sem SDS: sem modificação, NpAu e NpSiO₂, de 1,20 $\mu\text{mol/L}$ (428 $\mu\text{g/L}$); 0,542 $\mu\text{mol/L}$ (193 $\mu\text{g/L}$) e 3,95 $\mu\text{mol/L}$ (1410 $\mu\text{g/L}$), respectivamente

Para os EPCs na solução contendo SDS 1,00mmol/L: sem modificação, para os eletrodos modificados com as NpAu e NpSiO₂, 0,0975 $\mu\text{mol/L}$ (34,8 $\mu\text{g/L}$); 0,299 $\mu\text{mol/L}$ (107 $\mu\text{g/L}$) e 0,0186 $\mu\text{mol/L}$ (6,63 $\mu\text{g/L}$), respectivamente. Para o limite de quantificação dos eletrodos para os eletrodos de pasta de carbono: sem modificação, NpAu e NpSiO₂, 0,297 $\mu\text{mol/L}$ (110 $\mu\text{g/L}$); 0,905 $\mu\text{mol/L}$ (323 $\mu\text{g/L}$) e 0,0563 $\mu\text{mol/L}$ (20,1 $\mu\text{g/L}$), respectivamente.

A adição do surfactante SDS na solução eletrolítica amplificou o sinal analítico da corrente atrelada a oxidação do VE possibilitando assim a melhoria do sinal ruído e a detecção de quantidades menores do analito nas amostras. Dentre os eletrodos testados para o método desenvolvido no presente trabalho, é importante salientar que os melhores resultados foram obtidos quando se tratava do EPC modificado com as NpSiO₂, onde o LD e LQ para este eletrodo, tanto na solução com SDS quanto na solução sem SDS foram dados dentro do limite estabelecido para a regulamentação pela ANA e pelo Ministério da Saúde. Sendo assim, os eletrodos desenvolvidos neste trabalho, podem ser utilizados como biossensores para a detecção eletroanalítica do hormônio natural 17- β -Estradiol, sendo estas sensíveis e responsivos a este hormônio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadi, T. S., Logunov, S. L., & Mostafa, A. E.-Sayed. (2009). Size-Dependent Electron Dynamics of Gold Nanoparticles. In ACS Symposium Series. <https://doi.org/10.1021/bk-1997-0679.ch010>
- Almeida, A.-S. F. de, Bentes, J. L. da S., & Correa Junior, A. (2021). Síntese de nanopartículas – revisão de literatura. *Revista Agraria Academica*, 4(2), 53–69. <https://doi.org/10.32406/v4n2/2021/53-69/agrariacad>
- Alvarez, L. A. C., Guimarães, M. C. C., & Oliveira, J. P. (2018). Proposição de uma rota verde de nanopartículas de ouro reduzidas com resina de *Virola oleifera* através do planejamento fatorial.
- Arantes, T. M., Pinto, A. H., Leite, E. R., Longo, E., & Camargo, E. R. (2012). Synthesis and optimization of colloidal silica nanoparticles and their functionalization with methacrylic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 415, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.041>
- Araujo, K. S. de Antonelli, R., Gaydeczka, B., Granato, A. C., & Malpass, G. R. P. (2016). Processos oxidativos avançados: uma revisão de fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 11(2), 15. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1862>
- Atta, N. F., Galal, A., & Azab, S. M. (2011). Determination of morphine at gold nanoparticles/Nafion® carbon paste modified sensor electrode. *Analyst*, 136(22), 4682–4691. <https://doi.org/10.1039/C1AN15423K>
- Bard, A. J., Stratmann, M., & Unwin, P. R. (2003). *Encyclopedia of electrochemistry: Volume 3. (Vol. 3)*. Wiley-VCH.
- Behpour, M., Honarmand, E., & Ghoreishi, S. M. (2010). Nanogold-modified Carbon Paste Electrode for the Determination of Atenolol in Pharmaceutical Formulations and Urine by Voltammetric Methods. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(4), 845–849. <https://doi.org/10.5012/BKCS.2010.31.04.845>
- Bergamin, B., & Sotomayor, M. D. P. T. (2017). Polímeros Biomiméticos Híbridos Para Substâncias Estrogênicas Visando Desenvolvimento De Sensores Para Aplicação Na Área Biotecnológica.

- Bergamini, M. F., de Oliveira, F. C. M., & Zanoni, M. V. B. (2005). Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso. 30(2), 53–59. www.scielo.br/eqEcl.Quím
- Bilibio, U., & Trindade, M. A. G. (2014). DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA INDIVIDUAL E SIMULTÂNEA DAS FLUOROQUINOLONAS, LEVOFLOXACINA E NORFLOXACINA, EMPREGANDO MEIO MICELAR E PROCEDIMENTO DE DECONVOLUÇÃO.
- Brandt, E. M. F., Aquino, S. F. de, & Bastos, R. K. X. (2020). Revisão do Anexo XX da Portaria de Consolidação no 5 de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde (antiga Portaria MS No 2914 / 2011) Padrão de Potabilidade e Planos de Amostragem Substâncias Químicas – Fármacos e Desreguladores Endócrinos Subsídios. In Ministério da Saúde (p. 117).
- Callister, W. D. (2002). Ciência e engenharia de materiais: uma introdução. Livros Técnicos e Científicos.
- Camargo, M. H. de. (2011). Preparação De Nanopartículas De Sílica.
- Cancino, J., Marangoni, V. S., & Zucolotto, V. (2014). Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. *Química Nova*, 37(3), 521–526. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140086>
- Canevari, T. C., Cincotto, F. H., Nakamura, M., Machado, S. A. S., & Toma, H. E. (2016). Efficient electrochemical biosensors for ethynylestradiol based on the laccase enzyme supported on single walled carbon nanotubes decorated with nanocrystalline carbon quantum dots. *Analytical Methods*, 8(39), 7254–7259. <https://doi.org/10.1039/C6AY02178F>
- Cavalleri, O., Pinto, G., & Canepa, M. (2019). Self-assembly di DNA su superficie: uno studio combinato nanolitografia/spettroscopia ottica. *Istituto Lombardo (Rend. Scienze)*, 153, 131–146.
- Cesarino, I., Cincotto, F. H., & Machado, S. A. S. (2015). A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 210, 453–459. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2015.01.013>
- Chen, X., Shi, Z., Hu, Y., Xiao, X., & Li, G. (2018). A novel electrochemical sensor based on Fe₃O₄-doped nanoporous carbon for simultaneous determination of diethylstilbestrol

and 17 β -estradiol in toner. *Talanta*, 188, 81–90.
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.05.063>

Cincotto, F. H., & Machado, S. A. S. (2017). Detecção dos interferentes endócrinos estradióis e estriol em amostras ambientais e clínicas empregando eletrodos modificados com grafeno, nanopartículas metálicas e quantum dots [Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/T.75.2017.TDE-04012017-084055>

Cincotto, F. H., Moraes, F. C., & Machado, S. A. (2014a). Graphene nanosheets and quantum dots: a smart material for electrochemical applications. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 20(16), 4746–4753.
<https://doi.org/10.1002/CHEM.201304853>

Cincotto, F. H., Moraes, F. C., & Machado, S. A. S. (2014b). Graphene nanosheets and quantum dots: A smart material for electrochemical applications. *Chemistry - A European Journal*, 20(16), 4746–4753. <https://doi.org/10.1002/chem.201304853>

Codognoto, L., Zuin, V., Souza, D., Yariwake, J., Machado, S. A. s., & Avaca, L. A. (2004). Electroanalytical and chromatographic determination of pentachlorophenol and related molecules in a contaminated soil: A real case example. *Microchemical Journal*, 77, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2004.02.011>

Cunha, S., Silva, V. C. da, Napolitano, H. B., Lariucci, C., & Vencato, I. (2003). Reaction of acyclic enamines with methoxymethylene Meldrum's acid: synthetic and structural implications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(1), 107–112.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000100017>

Deroco, P. B., & Filho, O. F. (2019). PREPARAÇÃO DE ELETRODOS COM NOVOS MATERIAIS À BASE DE CARBONO PARA APLICAÇÃO EM ELETROANALÍTICA.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342.
<https://doi.org/10.1210/ER.2009-0002>

Faulkner, L. R. (1983). Understanding electrochemistry: Some distinctive concepts. *Journal of Chemical Education*, 60(4). <https://doi.org/10.1021/ed060p262>

- Feldman, M. (2014). Nanolithography: the art of fabricating nanoelectronic and nanophotonic devices and systems.
- Furtado, R. F., Dutra, R. A. F., Alves, C. R., Pimenta, M. G. R., & Guedes, M. I. F. (2008). Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos. Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E).
- Galli, A., de Souza, D., Garbellini, G. S., Coutinho, C. F. B., Mazo, L. H., Avaca, L. A., & Machado, S. A. S. (2006). Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Química Nova*, 29(1), 105–112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100020>
- Gama, E. G., & Oliveira, G. M. (2016). Electrodeposition of Gold Films from a Glycerol Solution on Carbon Paste Electrode and the Effect of Chemical and Electrochemical Parameters of Electrodeposition on the Electrode Performance in Potassium Ferrocyanide Solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28, 49–57. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160144>
- Gholivand, M., & Parvin, M. H. (2011). Voltammetric study of acetazolamide and its determination in human serum and urine using carbon paste electrode modified by gold nanoparticle. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 660, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.06.026>
- Gomes, E. S., Malaguti, Andréa Renata, & Mourão, H. A. J. L. (2017). DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ESTRIOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E URINA UTILIZANDO UM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM UM FILME DE POLI(METIONINA) E COBALTO.
- Gorup, L. F., Longo, E., Leite, E. R., & Camargo, E. R. (2011). Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 360(2), 355–358. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2011.04.099>
- Herbst, M. H., Macêdo, M. I. F., & Rocco, A. M. (2004). Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Química Nova*, 27, 986–992.
- Horisberger, M., & Rosset, J. (1977). Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 25(4), 295–305.

- Janegitz, B. C., dos Santos, F. A., Faria, R. C., & Zucolotto, V. (2014). Electrochemical determination of estradiol using a thin film containing reduced graphene oxide and dihexadecylphosphate. *Materials Science and Engineering: C*, 37(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2013.12.026>
- Jin, R., Charles Cao, Y., Hao, E., Métraux, G. S., Schatz, G. C., & Mirkin, C. A. (2003). Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation. *Nature*, 425(6957), 487–490. <https://doi.org/10.1038/nature02020>
- Kohles, S. S., Bradshaw, S., Mason, S. S., & Looft, F. J. (2011). A Multivariate Logistical Model for Identifying the Compressive Sensitivity of Single Rat Tactile Receptors as Nanobiosensors. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.1115/1.4002750>
- Lahcen, A. A., Baleg, A. A., Baker, P., Iwuoha, E., & Amine, A. (2017). Synthesis and electrochemical characterization of nanostructured magnetic molecularly imprinted polymers for 17- β -estradiol determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 698–705.
- Laube, N., Mohr, B., & Hesse, A. (2001). Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. *Journal of Crystal Growth*, 233(1–2), 367–374.
- Luo, L., Li, F., Zhu, L., Ding, Y., & Deng, D. (2013). Electrochemical sensing platform of natural estrogens based on the poly (L-proline)-ordered mesoporous carbon composite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 187, 78–83.
- Machado, K. S., Azevedo, J. C. R., & Braga, M. C. B. (2010). DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS NA BACIA DO ALTO IGUAÇÚ, REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA-PR.
- Maniasso, N. (2001). Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, 24(1), 87–93. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100015>
- Marcone, G. P. D. S. (2015). NANOTECNOLOGIA E NANOCIÊNCIA: ASPECTOS GERAIS, APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS NO CONTEXTO DO BRASIL. *Perspectivas Da Ciência e Tecnologia*, 7(2), 24.
- Martinez, M. S., Queiroz, S. C. do N. de, & Pires, J. (2017). Degradação fotooxidativa de 17-B-estradiol presente em efluente sintético de indústria de medicamentos hormonais

- veterinários por processo H₂O₂/UV. *Revista Eletrônica de Engenharia Civil*, 10(2). <https://doi.org/10.5216/reec.V10i2.34464>
- Martins, M. A., & Trindade, T. (2012). OS NANOMATERIAIS E A DESCOBERTA DE NOVOS MUNDOS NA BANCADA DO QUÍMICO. In *Quim. Nova* (Vol. 35, Issue 7).
- Montes, R. H. de O. (2015). Efeito do tamanho de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em sensores eletroquímicos para moléculas de interesse farmacêutico.
- Moraes, F. C., Rossi, B., Donatoni, M. C., de Oliveira, K. T., & Pereira, E. C. (2015). Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. *Analytica Chimica Acta*, 881, 37–43.
- Moreira, F., Maranhão, T., & Spinelli, A. (2018). Carbon paste electrode modified with Fe₃O₄ nanoparticles and BMI.PF₆ ionic liquid for determination of estrone by square-wave voltammetry. *Journal of Solid-State Electrochemistry*, 22. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3678-0>
- Moreira, F., & Spinelli, A. (2019). DESENVOLVIMENTO DE UM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO E O LÍQUIDO IÔNICO BMI.PF₆ PARA A DETERMINAÇÃO DEESTROGÊNIOS.
- Murray, C., Sun, S., Gaschler, W., Doyle, H., Betley, T., & Kagan, C. (2001). Colloidal synthesis of nanocrystals and nanocrystals superlattices. *IBM Journal of Research and Development*, 45, 47–56. <https://doi.org/10.1147/rd.451.0047>
- National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. (2021). SDBSWeb. <https://Sdbs.Db.Aist.Go.Jp/Sdbs/Cgi-Bin/Landingpage?Sdbsno=11076>.
- Nitschke, M., & Pastore, G. M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25(5), 772–776. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>
- Nossol, E. (2009). Novos eletrodos construídos a partir de diferentes nanoestruturas de carbono.
- Oliveira, B., & Bertazzoli, R. (2007). Estudo eletroquímico do efeito de surfactantes na eletrogeração de peróxido de hidrogênio.
- Oliveira, G. M. de, Barbosa, L. L., Broggi, R. L., & Carlos, I. A. (2005). Voltammetric study of the influence of EDTA on the silver electrodeposition and morphological and

- structural characterization of silver films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1(578), 151–158. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2004.12.033>
- Pacheco, W. F., Semaan, F. S., de Almeida, V. G. K., Ritta, A. G. S. L., & Aucelio, R. Q. (2013). Voltammetry: A brief review about concepts. *Revista Virtual de Química*, 5(4), 516–537.
- Paschoalino, M. P., Marcone, G. P. S., & Jardim, W. F. (2010). Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*, 33, 421–430.
- Pereira, D. F. A. (2014). Síntese e funcionalização de nanopartículas de ouro para a formação de bionanoconjugados para desenvolvimento de biossensores.
- Periasamy, A. P., Umasankar, Y., & Chen, S. M. (2009). Nanomaterials - acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 9(6), 4034–4055. <https://doi.org/10.3390/S90604034>
- Petrovic, S. (2021). Analytical Electrochemistry. In *Electrochemistry Crash Course for Engineers* (pp. 85–92). Springer.
- Pirich, C. L., de Freitas, R. A., Torresi, R. M., Picheth, G. F., & Sierakowski, M. R. (2017). Piezoelectric immunochip coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals for dengue detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 47–53.
- Rizzatti, I. M., Zanette, D. R., & Mello, L. C. (2009). Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. *Química Nova*, 32(2), 518–521. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200041>
- Sacht, S., Faria, A., Oliveira, M., & Cotta, A. (2016). MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL: TESTE DE NOVO SORVENTE. MÉTODO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL: TESTE DE NOVO SORVENTE. In *Revista Univap* (Vol. 22). <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v22i40.1591>
- Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews*, 112(5), 2739–2779.

- Santos, K. D., & Spinelli, A. (2013a). DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DOS HORMÔNIOS ESTRIOL E ESTRONA EM AMOSTRAS DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, FLUIDOS BIOLÓGICOS E ALIMENTOS.
- Santos, K. D., & Spinelli, A. (2013b). DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DOS HORMÔNIOS ESTRIOL E ESTRONA EM AMOSTRAS DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, FLUIDOS BIOLÓGICOS E ALIMENTOS.
- Satpati, A. K., & Bard, A. J. (2012). Preparation and characterization of carbon powder paste ultramicroelectrodes as tips for scanning electrochemical microscopy applications. *Analytical Chemistry*, 84(21), 9498–9504.
- Shimizu, L. C. B., Gama, E. G., Machado, D. S., Carlos, I. A., & de Oliveira, G. M. (2020). A new method to produce graphite decorated by electrodeposited metal: The case of silver electrodeposition process inside a graphite paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 870, 38. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114198>
- Silva, S. R., & Costa Júnior, E. de S. (2014). AVALIAÇÃO DO USO DE ESFERAS DE QUITOSANA COMO ADSORVENTE DE ETINILESTRADIOL EM SOLUÇÕES AQUOSAS.
- Silvério, L. C. B. S. (2015). Desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono modificado por prata eletrodepositada in situ e determinação eletroanalítica de dopamina.
- Simerville, J. A., Maxted, W. C., & Pahira, J. J. (2005). Urinalysis: A Comprehensive Review. *American Family Physician*, 71(6), 1153–1162. www.aafp.org/afp.
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1988). *Fundamentals of analytic chemistry*. Saunders College Publishing.
- Stober, W., Fink, A., & Ernst Bohn, D. (1968). Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1. In *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE* (Vol. 26).
- Švancara, I., Matoušek, M., Sikora, E., Schachl, K., Kalcher, K., & Vytřas, K. (1997). Carbon paste electrodes plated with a gold film for the voltammetric determination of mercury (II). *Electroanalysis*, 9(11), 827–833. <https://doi.org/10.1002/ELAN.1140091105>
- Teixeira Verbinnen, R., Silva Nunes, G., & Maria Vieira, E. (2010). DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS EM ÁGUA POTÁVEL USANDO CLAE-DAD. In *Quim. Nova* (Vol. 33, Issue 9).

- Tkach, V. v., Kushnir, M. v., Storoshchuk, N. M., de Oliveira, S. C., Luganska, O. v., Kopyika, V. v., Brios e Gala, H., Baddouh, A., & Yagodynets', P. I. (2019). A descrição teórica da detecção eletroanalítica do letrozol, assistida pelo composto VO(OH)-polipirrol, obtido catodicamente. *Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas*, 48(3), 662–676. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n3.84985>
- Tsai, T. C., Huang, F. H., & Chen, J. J. J. (2013). Selective detection of dopamine in urine with electrodes modified by gold nanodendrite and anionic self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 179–186. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2013.01.081>
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55–75.
- Vaz, C. J. P., Crestana, S., Machado, S. A. S., Mazo, L. H., Massaropi, M. R. da C., & Avaca, L. A. (1996). Determinação de pesticidas por técnicas eletroanalíticas. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 6.
- Wang, J. (2006). *Analytical electrochemistry* (John Wiley, Ed.; 3 Third edition). John Wiley & sons.
- Yakabe, C., Honda, A. M., & Magalhães, J. F. (2005). Determinação do 17- β -estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(3), 359–364.
- Yin, Y., & Alivisatos, A. P. (2005). Colloidal nanocrystal synthesis and the organic–inorganic interface. *Nature*, 437(7059), 664–670.
- Zhu, Y., Liu, X., & Jia, J. (2015). Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode. *Analytical Methods*, 7(20), 8626–8631.