



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA COSTA ROLIM GALVÃO

**MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO
17 β -ESTRADIOL UTILIZANDO UM ELETRODO DE
CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS
DE Fe₂O₃ SUPORTADAS SOBRE NANOTUBOS DE
CARBONO**

Londrina
2019

JULIANA COSTA ROLIM GALVÃO

**MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO
17B-ESTRADIOL UTILIZANDO UM ELETRODO DE
CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS
DE Fe_2O_3 SUPORTADAS SOBRE NANOTUBOS DE
CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dr. Roberta Antigo Medeiros

Londrina
2019

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

- G182 Galvão, Juliana Costa Rolim.
MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO 17 BETA-ESTRADIOL UTILIZANDO UM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE Fe₂O₃ SUPOSTADAS SOBRE NANOTUBOS DE CARBONO / Juliana Costa Rolim Galvão. - Londrina, 2019. 71 f.
- Orientador: Roberta Antigo Medeiros.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2019.
Inclui bibliografia.
1. Desreguladores endócrinos - Tese. 2. Hormônios - Tese. 3. Voltametria de onda quadrada - Tese. 4. Eletroanalítica - Tese. I. Medeiros, Roberta Antigo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . IV. Título.

CDU 54

JULIANA COSTA ROLIM GALVÃO

**MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO 17B-
ESTRADIOL UTILIZANDO UM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO
MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE Fe_2O_3 SUPORTADAS
SOBRE NANOTUBOS DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Química da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Antigo
Medeiros
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Julliana Izabelle Simionato
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 03 de maio de 2019.

*Ao meu esposo, Raony Rolim
por todo amor, cumplicidade e apoio
e por me inspirar e me ensinar a
ser uma pessoa cada dia melhor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por me dar saúde e força e me fazer entender que tudo que acontece em minha vida é benção ou é algo que tenho que aprender para meu crescimento.

À Prof^a. Dr^a. Roberta Antigo Medeiros pelo acolhimento, atenção e pelas contribuições que foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todo conhecimento compartilhado e por toda sua dedicação durante esses dois anos.

Aos professores Roberto de Matos, César Ricardo Teixeira Tarley e Luíz Henrique Dall' Antonia pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos alunos do LaEEM, GMPC e LADEMA pelo convívio diário e companheirismo, em especial à Aline que durante esses dois anos esteve sempre comigo compartilhando experiências.

Ao meu esposo Raony Rolim pelo amor, companheirismo e incentivo, por acreditar que isso seria possível, pela paciência e cumplicidade e por ser minha inspiração e motivo para concluir mais esta etapa.

Aos meus amigos Aline, Bruna e Max, minha gratidão! Obrigada por cada momento juntos, por cada palavra dita, por cada sorriso compartilhado e por cada momento de nervosismo que passamos juntos, minha gratidão pelos dias e pelas noites de estudos que com certeza me ajudou muito para chegar até aqui. Não tenho palavras para expressar o que vocês representam nessa jornada, desejo todo sucesso e que vocês realizem todos os seus sonhos.

À todos meus familiares e amigos, que torceram e estiveram junto comigo.

Minha eterna gratidão a todos.

*“I know who I was when I got up this morning, but I think I must have been
changed several times since then”*

(Alice’s Adventures in Wonderland)

GALVÃO, Juliana Costa Rolim. **Método voltamétrico para quantificação do 17β-estradiol utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de Fe₂O₃ suportadas sobre nanotubos de carbono**. 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um método eletroanalítico para a quantificação do hormônio 17β-estradiol (E2) em amostras de medicamentos, urina sintética e água do lago Igapó (Londrina-PR). Para isso, utilizou-se como eletrodo de trabalho o carbono vítreo (GCE) modificado com nanopartículas de óxido de ferro suportadas sobre nanotubos de carbono (Fe₂O₃-CNT/GCE). As técnicas eletroquímicas utilizadas foram voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ). O E2 apresentou um perfil voltamétrico com apenas um pico de oxidação irreversível e bem definido em aproximadamente 0,8 V. A modificação do GCE com as nanopartículas de Fe₂O₃-CNT proporcionou efeito eletrocatalítico, aumentando significativamente a intensidade da corrente de pico e diminuindo o potencial de oxidação do E2 quando comparado ao GCE sem modificação. A curva analítica obtida para o E2 apresentou faixa linear de concentração entre 5,0 e 100,0 nmol L⁻¹ com um limite de detecção e quantificação de 4,4 nmol L⁻¹ e 14,6 nmol L⁻¹, respectivamente. O método eletroanalítico proposto foi utilizado em estudos de adição e recuperação em amostras de água do lago Igapó e urina sintética apresentando recuperações satisfatórias. Também foram analisadas amostras de medicamentos contendo E2, os resultados foram concordantes com os obtidos pelo método comparativo, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, a um nível de confiança de 95%. O sensor eletroquímico, bem como o método eletroanalítico desenvolvido são uma alternativa simples e rápida para a quantificação do E2, além de apresentarem outras vantagens, como, baixa adsorção do produto da oxidação do E2, boa precisão, baixo consumo de reagentes, podendo também ser utilizado em análises “*in loco*”.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos. Óxido de Ferro. Eletroanalítica. Hormônios. Eletrodo modificado. Voltametria de onda quadrada.

GALVÃO, Juliana Costa Rolim. **Voltammetric method for quantification of 17 β -estradiol using a glass carbon electrode modified with Fe₂O₃ nanoparticles supported on carbon nanotubes.** 2019. 71 p. Dissertation (Master in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

In this work an electroanalytical method was developed for the quantification of the 17 β -estradiol (E2) hormone in drugs, synthetic urine and Igapó lake (Londrina-PR) water samples. For this, a glass carbon electrode modified with iron oxide nanoparticles supported on carbon nanotubes (Fe₂O₃-NTC / GCE) was used as working electrode. The electrochemical techniques used were cyclic voltammetry (VC) and square wave voltammetry (VOQ). E2 presented a voltammetric profile with a unique irreversible and well defined oxidation peak at around 0.8 V. The modification of the GCE with the Fe₂O₃-CNT nanoparticles provided an electrocatalytic effect, increasing the peak current intensity and reducing the oxidation potential of E2 when compared to bare CGE. The analytical curve obtained for E2 presented a linear concentration range between 5.0 and 100 nmol L⁻¹ with a detection limit and quantification of 4.4 nmol L⁻¹ and 14.6 nmol L⁻¹, respectively. The proposed electroanalytical method was used in addition and recovery studies in a water sample from Lake Igapó and synthetic urine with satisfactory recoveries. Two Drugs samples containing E2 were also analyzed, the obtained results were concordant with those obtained by the comparative method (HPLC) at a confidence level of 95%. The electrochemical sensor as well as the developed electroanalytical method is a simple and fast alternative for the quantification of E2 in low concentrations, besides it has other advantages, such as low adsorption of E2 oxidation product, good precision, low reagent consumption and also can be used for "in situ" analysis.

Keywords: Estradiol, Iron Oxide, Carbon nanotubes, Glassy carbon, Square wave voltammetry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fórmula estrutural do E2 17
- Figura 2** – Representação da estrutura cristalina do Fe_2O_3 . Os átomos de ferro e oxigênio estão representados pelas cores vermelho e preto respectivamente. 23
- Figura 3** – Esquema do preparo da suspensão e modificação do GCE com Fe_2O_3 -NTC..... 30
- Figura 4** – (a) Voltamogramas cíclicos obtidos com (—) GCE sem modificação; Fe_2O_3 -CNT/GCE (—) $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e (—) $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com (—) GCE sem modificação; Fe_2O_3 -CNT/GCE (—) $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e (—) $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, ambos em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo E2 $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 35
- Figura 5** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos com (a) GCE sem modificação, (b) GCE-CNT e (c) Fe_2O_3 -CNT/GCE- em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo E2 $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. 36
- Figura 6** – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para (a) GCE e (b) Fe_2O_3 -CNT/GCE. 38
- Figura 7** – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes eletrólitos: (—) tampão BR pH 7,0; (—) tampão fosfato pH 7,0; (—); KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 contendo E2 $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ empregando-se o Fe_2O_3 -CNT/GCE; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 39
- Figura 8** – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações hidrogeniônicas em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (10 % etanol v/v) pH 2,0 (—); 4,0 (—); 6,0 (—); 7,0 (—); 8,0 (—) e 10,0 (—) para $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de E2 utilizando o Fe_2O_3 -CNT/GCE; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 40
- Figura 9** – Relação entre o potencial de oxidação do E2 em diferentes valores de pH 41
- Figura 10** – Distribuição das espécies de E2 de acordo com o pH da solução. 42
- Figura 11** – (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura, a – i: $10 - 250 \text{ mV s}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (10 % etanol v/v) pH = 7,0 contendo E2 $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o Fe_2O_3 -CNT/GCE. (b) Dependência da corrente de pico pela velocidade de varredura para o E2. O gráfico inserido corresponde à dependência de $\log_{10} i_p$ vs $\log_{10} \nu$ para o E2 s^{-1} 44

- Figura 12** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes valores de frequência de aplicação dos pulsos de potencial ($10 - 100 \text{ s}^{-1}$) em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 (10% etanol v/v) contendo E2 $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; parâmetros da VOQ: $\alpha = 50,0 \text{ mV}$, $\Delta E 5,0 \text{ mV}$45
- Figura 13** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes valores de amplitude de pulso de potencial ($10 - 150 \text{ mV}$), em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 (10% etanol v/v) contendo E2 $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E 5,0 \text{ mV}$46
- Figura 14** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes valores de incremento de varredura ($1 - 12 \text{ mV}$) em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7 (10% etanol v/v) contendo E2 $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 40 \text{ mV}$,...47
- Figura 15** – Proposta de mecanismo para a reação de oxidação eletroquímica do E2 sobre a superfície do $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CNT/GCE}$49
- Figura 16** – **(a)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos com $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CNT/GCE}$ em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 (10% etanol v/v) contendo E2 em diferentes concentrações de E2: (a – j) 0,005; 0,01; 0,03; 0,05; 0,08; 0,10; 0,30; 0,50; 0,80 e $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; **(b)** Curva analítica obtida para o E2 no intervalo de concentração 5,0 e $100,0 \text{ nmol L}^{-1}$ (faixa linear). Parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta ES = 6 \text{ mV}$. ($N = 3$).50
- Figura 17** – Cromatogramas obtidos para o E2 (a – f): 30, 50, 100, 300, 500, 800 e $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($t = 8,20 \text{ min}$; $\lambda = 220 \text{ nm}$), fase móvel metanol/água (70:30 v/v) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, em coluna C18. Gráfico inserido: Curva analítica obtida para o E2 na faixa de concentração de 30 a $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do E2.....	17
Tabela 2 - Parâmetros analíticos obtidos para a determinação do E2 pelo método proposto e por outros trabalhos descritos na literatura	52
Tabela 3 – Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intra-dias e entre-dias para o E2	54
Tabela 4 – Desvio padrão relativo obtidos nos estudos de interferentes na proporção de 1:10 (E2:interferente).	55
Tabela 5 – Resultados obtidos na determinação de E2 em amostras ambientais e biológicas	56
Tabela 6 – Resultados obtidos na determinação de E2 em amostras de medicamentos.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Au-NPs	Nanopartículas de ouro
CNT	Nanotubos de Carbono
DE	Desreguladores endócrinos
DHP	Dihexadecilhidrogenofosfato
DPAdSV	Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry (Voltametria de retenção adsortiva de pulso diferencial)
DPV-FIA	Voltametria de Pulso Diferencial - Flow injection analysis (análise por injeção em fluxo)
E2	17 β -estradiol
E _p	Potencial de pico
E _{p/2}	Potencial de meio pico
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
Fe ₂ O ₃ -CNT/GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de óxido de ferro
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
GCE-CNT	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono
I _p	Corrente de pico
KCl	Cloreto de Potássio
K _{ow}	Constante de solubilidade octanol/água
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MWCNT	Nanotubos de carbono de múltiplas paredes
pKa	Log da constante de acidez
RSD	Desvio Padrão Relativo
Sw	Solubilidade em água
t _{1/2}	Tempo de meia-vida
Tampão BR	Tampão de Britton-Robinson
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria cíclica

VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
α	Coefficiente de transferência eletrônica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 17β-ESTRADIOL.....	17
1.2 ELETRODOS MODIFICADOS	22
1.2.1 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs).....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	27
3.2 EQUIPAMENTOS	28
3.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO SUPOSTAS SOBRE NANOTUBOS DE CARBONO E PREPARO DO SENSOR ELETROQUÍMICO	29
3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ELETROANALÍTICO	31
3.5 MÉTODO COMPARATIVO PARA QUANTIFICAÇÃO DO E2	32
3.6 PREPARO DE AMOSTRA	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO E2 UTILIZANDO O SENSOR Fe₂O₃CNT/GCE.....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO Fe₂O₃-CNT/GCE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	37
4.3 ELETRÓLITO SUPORTE E EFEITO DE PH	38
4.4 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA	42

4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	44
4.6 MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO E2	47
4.7 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	49
4.8 QUANTIFICAÇÃO DO E2 EM AMOSTRA DE MEDICAMENTOS, ÁGUA DO LAGO IGAPÓ E URINA SINTÉTICA UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO	54
5 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental é um sério problema conhecido pela população há algumas décadas. Porém, nos últimos anos os chamados poluentes emergentes têm atraído ainda mais a atenção por serem agentes químicos potencialmente tóxicos que estão presentes no nosso cotidiano. São encontrados em produtos comerciais e farmacêuticos como, por exemplo, os antibióticos, anestésicos, antilipêmicos, meios de contrastes de raios-X, anti-inflamatórios e os hormônios naturais ou sintéticos (SILVA et al., 2011, AZEVEDO et al., 2013, BRAGA, 2018, FERNANDES, et al., 2012, NIKOLAOU et al., 2013, BILA, et al., 2003).

Muitos desses poluentes emergentes podem agir como desreguladores endócrinos, ou seja, podem alterar as funções de biossíntese, transporte, ação e/ou eliminação de hormônios naturais do corpo (SILVA et al., 2011).

Entre os contaminantes considerados como desreguladores endócrinos encontram-se os hormônios estrogênicos, um grupo de compostos biologicamente ativos produzidos através da molécula do colesterol e possuem estruturas moleculares parecidas, sendo predominantemente hormônios femininos. Entre os hormônios naturais estão a estrona (E1), o 17β -estradiol (E2) e o estriol (E3) e o hormônio sintético 17α -etinilestradiol (EE2) (SIEGENTHALER et al., 2017).

O uso desses hormônios entre as mulheres na idade adulta vem crescendo cada vez mais, seja como método contraceptivo, reposição hormonal para mulheres no período da menopausa ou para mulheres que estão sendo submetidas ao tratamento de infertilidade (SPRITZE, 1999, FILHO et al., 2006).

Com isso, tais hormônios vêm sendo encontrado em concentrações significativas em efluentes devido a sua eliminação via fezes e urina e ao descarte inadequado. Além disso, eles permanecem inalterados no meio ambiente, e não são eliminados completamente nas estações de

tratamentos de água e esgoto, podendo chegar à população pelo consumo da água potável (BILA & DEZOTTI, 2007; KOH et al., 2008; VAJDA et al., 2011).

Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos simples e rápidos para a quantificação e monitoramento destes estrogênios se faz necessário, podendo ser utilizados tanto para análises de controle de qualidade em amostras de medicamento, quanto para análises de amostras ambientais e biológicas a fim de haver um controle da quantidade de hormônios que estão sendo descartados.

Os métodos mais comuns utilizados para a determinação e quantificação dos hormônios estrogênios utilizam técnicas instrumentais mais tradicionais, como a cromatografia, porém, essa técnica usualmente necessita de um preparo de amostra mais complexo, faz uso de solventes orgânicos e o tempo de análise costuma ser longo quando comparado a outras técnicas e, não possibilitam a análise “*in loco*” (CESEN et al., 2017; BILA & DEZOTTI, 2007).

A utilização de técnicas instrumentais mais recentes para determinar compostos orgânicos e inorgânicos, como as técnicas eletroanalíticas vêm crescendo significativamente, devido ao fato de apresentarem exatidão, precisão e sensibilidade comparáveis às técnicas cromatográficas. Além disso, apresentam baixo custo relativo, não fazem uso de solventes orgânicos e exigem curtos tempos de análise. (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Técnicas como a voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e amperometria vêm sendo utilizadas em análises de medicamentos águas, solos, alimentos e fluídos biológicos como sangue, plasma sanguíneo e urina (SKOOG, 2009; BATCHELOR-MCAULEY, 2015).

As informações obtidas com o uso de técnicas eletroanalíticas são dependentes da superfície eletródica (eletrodo de trabalho); conseqüentemente dependerá de dois fatores: o comportamento redox do analito e as correntes residuais obtidas no intervalo de potencial avaliado. Também se deve considerar a janela de potencial de trabalho, a condutividade elétrica, a

reprodutibilidade da superfície, as propriedades mecânicas, o custo de fabricação, a disponibilidade e toxicidade do material utilizado (WANG, 1985).

Portanto, a escolha do material do eletrodo de trabalho é de grande importância considerando que as respostas obtidas são relacionadas às reações redox que ocorrem em sua superfície ou na interface eletrodo-solução. Desta forma, o analito de interesse pode interagir com a superfície eletródica, resultando na transferência de elétrons. Os eletrodos a base de carbono são bastante utilizados tanto na eletroquímica quanto na eletroanalítica. Esses possuem propriedades mecânicas bastante interessantes, apresentam faixa ampla de potencial de trabalho, são razoavelmente inertes quimicamente e mostram facilidade de modificação (PECKOVÁ et. al., 2009).

Existem vários tipos de materiais carbônicos que estão sendo utilizados como eletrodos; dentre estes estão o carbono vítreo (GCE), carbono pirolítico, pasta de carbono, grafite, diamante dopado com boro, etc. Porém, muitos destes eletrodos podem apresentar baixa seletividade, baixa sensibilidade para o método desenvolvido e alta adsorção dos produtos de oxidação do analito, causando a passivação do eletrodo.

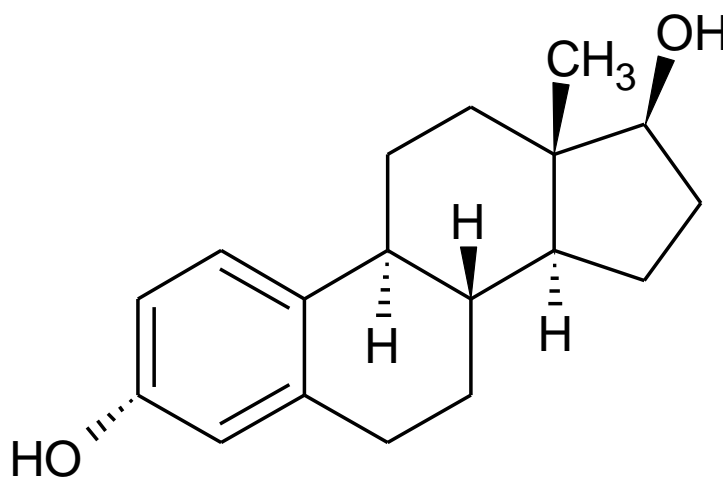
Para contornar tais problemas, o uso de modificadores tem se tornado uma alternativa bastante vantajosa. Na literatura, são encontrados inúmeros trabalhos utilizando eletrodo de carbono modificado com diferentes materiais, tais como, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, grafeno, entre outros (KAZICI, 2018, JING et al., 2013, TAO et al., 2014).

Sendo assim, neste trabalho foi desenvolvido um método eletroanalítico para a quantificação de E2 utilizando como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de Fe_2O_3 suportadas sobre nanotubos de carbono (CNT), essa modificação foi realizada a fim de evitar a passivação do eletrodo e aumentar a sensibilidade do método.

1.1 17 β -ESTRADIOL

Dentre os hormônios estrogênicos o (17 β)-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol, também conhecido com 17 β -estradiol (E2) (Figura 1) é um hormônio esteróide natural produzido por todos os mamíferos, nos ovários e nos testículos, é responsável por muitos processos fisiológicos, desenvolvimento e manutenção do sistema reprodutor, ciclo menstrual, metabolismo lipídico sendo muito importante para manter as funções dos tecidos da pele, cérebro e dos seios (LI, 2015). Para os homens o E2 também possui papel significativo na estruturação dos ossos e na espermatogênese (SMAJDOR, 2018).

Figura 1 – Fórmula estrutural do E2



Fonte: Próprio autor.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do E2

Nome	MM (g mol ⁻¹)	S _w (mg L ⁻¹)	LogK _{ow}	pK _a
17 β -estradiol	272,4	13	3,94	10,7

Adaptado de Silva et al., 2012.

MM: massa molar;

S_w: solubilidade em água;

Log K_{ow}: logaritmo da constante de partição octanol/água;

pK_a: produto da constante de acidez

O E2 nas mulheres é responsável, principalmente, pela fertilidade feminina (HAO et al., 2011). Os níveis de E2 normalmente variam durante o ciclo menstrual da mulher, na pré-menopausa estão na faixa de 15 a 350 pg/mL e diminui para <10 pg/mL no período pós-menopausa (ELMLINGER et al., 2002).

Sendo assim, todos os seres humanos e animais mamíferos, excretam o E2 pela urina ou fezes em diferentes quantidades, que variam em relação ao sexo, idade, dieta, gravidez e estado de saúde do indivíduo (LINTELMANN et al., 2003).

Naturalmente, os homens excretam na natureza aproximadamente 1,6 µg/24 h, as mulheres no período menstrual excretam ~ 3,5 µg/24 h, esse valor sobe significativamente na gestação (~ 259 µg/24h) e decai na menopausa (~ 2,3 µg/24h) (FILHO et.al., 2006).

Além disso, a ingestão desse hormônio como método contraceptivo e de reposição hormonal vem crescendo significativamente a cada ano e, aliados a excreção natural fazem com que o E2 esteja cada vez mais presente no meio ambiente (TSENG et.al., 2015). Sendo que, uma vez excretados seguem para a rede coletora, e posteriormente, entram em contato com o meio ambiente, por meio, efluentes *in natura* ou até mesmo processados (FILHO et al., 2006).

O E2 é um disruptor endócrino e em níveis alterados no organismo pode causar uma série de danos e podem estar associados a enfermidades como, por exemplo, valores acima da normalidade podem causar a puberdade precoce, câncer de ovário, hipertireoidismo ou cirrose. Baixos níveis de E2 implicam em menopausa, insuficiência ovariana, síndrome do ovário policístico e infertilidade (American Association 2018; SILVA et al., 2013).

Hu e colaboradores (2015) relataram em suas pesquisas que mesmo em baixas concentrações o E2 pode causar nos seres humanos e em outras espécies um desequilíbrio celular, causando assim diversas alterações patológicas nos sistemas cardiovascular, imunológico, reprodutivo e nervoso.

Estudos também demonstraram que o E2 em concentrações menores que $1,0 \text{ ng/L}^{-1}$ é capaz de induzir a síntese de vitolegenina (uma proteína específica feminina) em peixes machos, sendo que o desenvolvimento de características intersexuais e/ou falha no desenvolvimento de características secundárias induzirá mudanças na reprodução destes (RODGERS-GRAY et al., 2000; YING ET AL., 2002; RACZ e GOEL, 2010; SILVA et al., 2013).

Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos simples, com baixo custo que permitam a quantificação do hormônio E2 em concentrações muito baixas, (na escala de nmol L^{-1}), em amostras reais e de preferencia “*in loco*”, se faz necessário.

O comportamento e destino dos esteróides no meio ambiente dependem de suas características físico-químicas e das propriedades do meio. A solubilidade em água (S_w) depende de parâmetros como: temperatura, força iônica, pH e pressão. De acordo com a Tabela 1, o E2 possui uma baixa solubilidade em água (13 mg L^{-1}). Além disso, o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) é igual a 3,94, o que indica certa hidrofobicidade da molécula, que leva a um alto potencial de sorção sendo capaz de se bioacumular nos sedimentos e na biota (FILHO et al., 2006, AURIOL et al., 2006, SILVA et al., 2012).

No Brasil, o tratamento de esgoto está longe de ser considerado adequado, principalmente nas regiões norte e nordeste do país. Ademais, os tratamentos tradicionais de água e esgoto, não são capazes de remover completamente tais substâncias, hoje classificadas como poluentes emergentes (JOHNSON et al., 2004; JOSS et al., 2004; BILA e DEZOTTI, 2007; COMBALBERT e HERNANDEZ-RAQUET et al 2010; BOVIER et al., 2018; MA e YATES, 2018).

A resolução 430/2011 do CONAMA não traz um limite máximo E2 que possa estar presente na água sem que exista influência na vida dos seres vivos.

A Farmacopeia Brasileira preconiza como método oficial para determinação do E2 a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BRASIL,

2010). Na literatura são encontrados vários trabalhos descrevendo métodos para a determinação do E2, empregando-se GC-MS (CESEN et al., 2017; SONG 2018), CLAE-DAD (MERIB et al., 2018), LC-MS (SUN et al., 2018; DUGHERI 2018), TLC (KUPCOVA et al., 2018), CLAE (WANG e JSENG 2005), RP-UFLC (MNGUNI et al., 2018).

Na literatura também foram encontrados alguns trabalhos reportando o uso de algumas técnicas eletroquímicas no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação do E2. Hu et al. (2002), desenvolveram um método utilizando um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com Nafion e o surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio. Os resultados obtidos na amostra de sangue demonstraram que a corrente de pico é proporcional à concentração de E2 na faixa de 0,025 a 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e o limite de detecção (LD) obtido foi de 0,001 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Terui e Tanaka (2006) empregaram um CGE modificado com nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT)–Nafion para detecção do E2. O eletrodo modificado demonstrou um aumento da corrente de pico anódico para o E2 comparado com o valor obtido usando o GCE sem modificação. Neste trabalho, também foi estudado por VOQ o efeito do tempo de acumulação cujo valor selecionado foi de 5 minutos. A faixa linear de concentração foi obtida entre 0,25 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LD foi de 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Azevedo e colaboradores (2013) construíram um sensor híbrido para determinação de E2 em amostra de água, utilizando um eletrodo de ouro modificado incorporando polímeros baseado na N-feniletilenodiaminometacrilamida combinado com um polímero molecularmente impresso (MIP). Os resultados obtidos por VC apresentaram uma faixa de concentração linear entre 0,1 e 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LD de 0,69 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Zhang e colaboradores (2014) utilizaram um GCE modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) e MIP, para determinar E2 em amostras de leite. As AuNPs foram eletrodepositadas na superfície do GCE e foram usadas para aumentar a área de superfície do eletrodo a fim de amplificar o sinal de corrente. A faixa de concentração linear foi de $3,67 \times 10^{-9}$ a $3,67 \times 10^{-4}$ $\mu\text{mol L}^{-1}$

e o LD de $4,69 \times 10^{-9} \mu\text{mol L}^{-1}$. A taxa de recuperação de E2 nas amostras de leite variaram entre 84,7 e 102,9%.

Os autores Lahcen et al. (2017) relataram a síntese, caracterização e o estudo eletroquímico de um polímero magnético molecularmente impresso ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-MIP}$) sob um eletrodo de pasta de carbono (CPE) para a determinação do E2 em amostras de água de rio. A corrente do pico de oxidação foi linearmente relacionada à concentração do E2 na faixa de 0,05 a $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com um LD de $20,0 \text{ nmol L}^{-1}$.

Ozcan e Topcuogullari (2017) empregaram um CPE modificado com um nanocompósito de nanopartículas de ouro e grafeno para a determinação de E2 em amostras de leite e medicamentos. O nanocompósito aumentou a área de superfície efetiva do eletrodo, melhorando assim a sua resposta. A curva analítica foi obtida em uma faixa linear de concentração entre 0,1 e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LD de $0,0074 \mu\text{mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo (RSD) de dez medidas foi de 2,89% e a recuperação do E2 em amostras reais de leite e farmacêuticas foi de 106,62 e 110,36%, respectivamente.

Braga e colaboradores (2018) construíram um sensor eletroquímico utilizando óxido de grafeno reduzido e MIP sobre um CPE, para determinar E2 em amostras de água de rio. O tampão fosfato pH 7,0 foi utilizado com eletrolito suporte e o E2 apresentou um pico de oxidação em, aproximadamente, +0,55 V. A faixa linear de concentração foi de 0,16 a $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ com um LD de $0,027 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Antoniazzi et al. (2018), empregaram um CPE modificado com óxido de cobre (II), para a determinação de E2 em amostras de urina e soro de leite utilizando a VOQ. O pico de oxidação do E2 foi observado em aproximadamente 0,58 V usando tampão BR em pH 8,0 como eletrolito suporte. O LD obtido foi de $21,0 \text{ nmol L}^{-1}$ com faixa linear de concentração de 60,0 a $800,0 \text{ nmol L}^{-1}$.

Smajdor e colaboradores (2018) propuseram um método voltamétrico para determinação do E2 utilizando um GCE modificado de negro de fumo. A curva analítica foi linear na faixa de concentração de 0,15 a 3,5

$\mu\text{mol L}^{-1}$. O método proposto foi utilizado nos estudos de adição e recuperação em amostras de comprimidos e em gel contendo E2, obtendo-se recuperações entre 99 e 106%.

A maioria dos estudos supracitados fez o uso de eletrodos modificados, alguns apresentam um preparo e modificação do eletrodo de trabalho bastante trabalhoso, demorado e com materiais de custos relativamente altos, outros utilizaram modificadores mais simples e com preparo mais rápido, porém não alcançaram LDs muito baixos. Portanto, o uso de novos materiais, com modificações mais rápidas e que proporcionem ao método a detecção de menores concentrações se torna interessante.

1.2 ELETRODOS MODIFICADOS

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM), foi utilizado primeiramente por Murray e colaboradores, na década de 70. O objetivo da modificação era pré estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, a fim de alterar a seletividade e a reatividade do eletrodo (MURRAY et al., 1988, PEREIRA et al., 2002, RIBEIRO, 2009).

Nas últimas décadas o uso de eletrodos modificados para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos vem crescendo significativamente, trazendo assim, a necessidade do desenvolvimento de novos materiais para serem utilizados. Essas modificações, em geral, trazem algumas vantagens como, efeito eletrocatalítico, uma baixa adsorção do analito, ou do produto gerado na reação de oxidação ou redução, e um aumento da seletividade e sensibilidade do método.

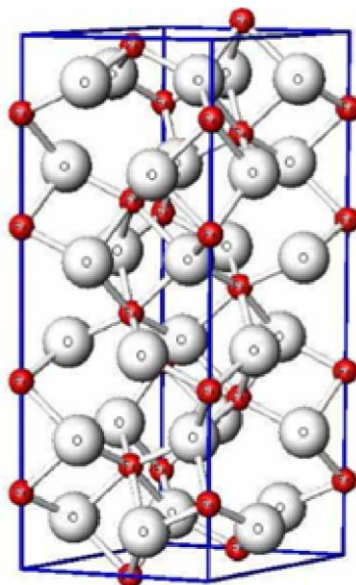
Um eletrodo modificado compõe-se de duas partes, a parte que é denominada como eletrodo base e a outra é a camada do modificador químico, o eletrodo base deve conter características eletroquímicas adequadas e ser apropriado para o método escolhido para a imobilização do material modificante (RIBEIRO, 2009). Dentre os eletrodos de trabalhos mais utilizados estão o GC (SMAJADOR et al., 2018), ouro (AZEVEDO et al., 2013), pasta de

carbono (BRAGA et al., 2018), platina (PEREIRA et al., 2002) e diamante dopado com boro (BROCENSCHI et al 2014).

Entre os novos materiais utilizados para a modificação desses substratos estão os óxidos metálicos como, por exemplo, o óxido de Ferro (III) (Fe_2O_3). Os óxidos de ferros são compostos encontrados na natureza e podem ser produzidos em laboratório com grande facilidade.

O Fe_2O_3 (Figura 2), na fase α , é a última etapa na transformação de outros óxidos de ferro, esta fase é usada em várias áreas devido a sua alta resistência à corrosão e seu baixo custo (LEÃO NETO, 2015). É estável em meio aquoso em $\text{pH} > 3$ (SOUZA, 2011, RADHAKRISHAN et al., 2014; HARRAZ et al., 2016). Além disso, o Fe_2O_3 possui propriedades catalíticas importantes nas reações de oxidação devido à alta mobilidade de íons oxigênio em sua superfície.

Figura 2 – Representação da estrutura cristalina do Fe_2O_3 . Os átomos de ferro e oxigênio estão representados pelas cores vermelho e preto respectivamente.



Fonte: SOUZA, 2011.

A literatura reporta vários trabalhos utilizando o Fe_2O_3 para a modificação de eletrodos. Suresh e colaboradores (2013) relataram uma síntese de nanopartículas de Fe_2O_3 utilizando o método hidrotermal. As nanopartículas sintetizadas foram utilizadas na modificação do GCE para detecção de pirocatecol em solução tampão fosfato pH 7,4 por VC e cronoamperometria. O eletrodo modificado apresentou maior intensidade de corrente de pico quando comparado ao GCE sem modificação, esse efeito eletrocatalítico foi atribuído ao aumento da área superficial devido à modificação.

Harraz et al. (2016), sintetizaram um nanocompósito de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /polianilina reticulada, através de um processo simultâneo de gelificação e polimerização. O nanocomposito foi utilizado para modificar um eletrodo de carbono vítreo para detecção eletroquímica de hidrazina. Singh e colaboradores (2016) sintetizaram nanopartículas de Fe_2O_3 utilizando o método de coprecipitação via tratamento térmico, utilizando cloreto ferro. As nanopartículas foram utilizadas para modificar um GCE para detecção de acetaminofeno.

1.2.1 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)

Os CNTs vêm sendo utilizado em diversas aplicações nas áreas da química e física dos materiais, possuem propriedades singulares como alta condutividade térmica e elétrica, propriedades óticas, alta resistência mecânica e alta área eletroativa (MERKOÇI et al., 2005).

Os CNTs são estruturas cilíndricas de carbono formadas pelo enrolamento de folhas de grafite, e possuem diâmetro de poucos nanômetros e comprimento da ordem de microns (AJAYAN, 1999, FERREIRA, 2003; PEREIRA, 2002).

As propriedades tão características dos CNTs estão interligadas à combinação de sua dimensionalidade, estrutura e topologia, isto se deve a composição básica do retículo cristalino dos nanotubos com ligações

covalentes C-C como nas camadas de grafite. Portanto, nos nanotubos de carbono, o carbono também se encontra com hibridização sp^2 (FERREIRA, 2003).

Existem dois tipos de CNTs, os Singlewalled Carbon Nanotubes (SWCNTs) ou no português os Nanotubos de Parede Simples e os Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNTs) ou no português Nanotubos de Paredes Múltiplas (WILDGOOSE et al., 2006) . As propriedades eletrônicas de ambos são bastante semelhantes, pois a junção entre os cilindros é fraca. Através da estrutura eletrônica quase uni-dimensional, o transporte eletrônico dos SWCNTs e dos MWCNTs se dá ao longo da superfície dos nanotubos (ZAPOROTSKOVA et al., 2016).

Os CNTs são utilizados como fonte de elétrons para display de tela plana, estocagem de gás, suporte para catalisadores, pontas para microscópios de sonda, na obtenção de membranas para filtração molecular, resistores quânticos e sensores (HUCZKO, 2002).

Na área da eletroquímica os CNTs estão sendo amplamente utilizados, principalmente, no desenvolvimento de sensores eletroquímicos e métodos eletroanalíticos para a determinação de diferentes substâncias. Os CNTs apresentam alta condutividade elétrica, são quimicamente inertes em soluções eletrolíticas e apresentam grande área eletroativa e janela de potencial operacional (GOODING, 2005; GAO et al.; 2012, BALA et al.; 2019, KHOSHNEVISAN et al.; 2019).

Dentro deste contexto, a união das propriedades do Fe_2O_3 com às dos MWCNTs podem proporcionar um material nanoestruturado bastante interessante para o desenvolvimento do sensor eletroquímico. Durante o processo de síntese as nanopartículas de Fe_2O_3 foram suportadas sobre os MWCNTs, este material foi utilizado na modificação do GCE, o qual foi utilizado no desenvolvimento do método eletroanalítico para a quantificação de E2.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sensor eletroquímico a partir da modificação de um GCE com nanopartículas de Fe_2O_3 suportadas sobre nanotubos de carbono (Fe_2O_3 -CNT), e desenvolver um procedimento eletroanalítico para a quantificação do hormônio E2 empregando a técnica voltamétrica de onda quadrada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o comportamento eletroquímico do sensor desenvolvido frente ao hormônio E2.

Comparar o perfil voltamétrico obtido por VC e VOQ para o E2 com o Fe_2O_3 -CNT/GCE, GCE modificado apenas com CNTs e GCE sem modificação.

Otimizar os parâmetros da VOQ para o desenvolvimento do método eletroanalítico.

Utilizar o método desenvolvido na quantificação do E2 em amostras de medicamentos;

Utilizar o método de adição e recuperação de E2 em amostras de água do lago Igapó (Londrina - PR) e urina sintética para avaliar o efeito de matriz.

Avaliar a exatidão do método eletroanalítico proposto utilizando um método de referência.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura com resistividade = 18,2 MΩ cm, proveniente de um sistema Milli-Q (Millipore®).

Os ácidos bórico (99,5%), fosfórico (85,0%), acético (99,9%), clorídrico e úrico (99,8%), bem como sulfato de sódio (99,0%), fosfato monopotássico (99,0%), fosfato trissódico e dissódico, cloreto de sódio (99,0%), cloreto de cálcio hidratado, hidróxido de sódio (98,0%), álcool isopropílico (99,5%) foram obtidos da Sigma-Aldrich e da Merck.

Os medicamentos, de diferentes marcas, contendo E2 na dosagem de 1,0 e 2,0 mg/comprimido foram adquiridas em uma farmácia local, na cidade de Londrina, estado do Paraná, Brasil.

Soluções de tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹ (BR), tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ e soluções de cloreto de potássio 0,1 mol L⁻¹ (KCl) foram utilizadas no estudo do eletrólito suporte. A solução de tampão BR foi preparada pela dissolução de 0,494 g de ácido bórico, 0,45 mL de ácido fosfórico e 0,457 mL de ácido acético, em um balão volumétrico de 200 mL cujo volume foi completado com água ultrapura. Para o ajuste do pH da solução tampão BR foi adicionado NaOH 2,0 mol L⁻¹.

A solução tampão fosfato foi preparada pela dissolução de 2,355 g de fosfato monopotássio e 3,925 g de fosfato dissódico. A solução de cloreto de potássio 0,1 mol L⁻¹ foi preparada a partir de 1,882 g de KCl 99 % (m/m) em um balão volumétrico de 250 mL que foi completado com água ultrapura. Para o ajuste de pH foi adicionado NaOH 2,0 mol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. A solução de KCl pH 7 foi escolhida como eletrólito suporte para a determinação de E2.

Solução estoque de E2 foi preparada na concentração de 0,1 mol L⁻¹ pela dissolução de 0,0272 g em etanol, em um eppendorf de 1,0 mL e, posteriormente, foram realizadas as diluições necessárias.

A solução de lactose, estearato de magnésio, ureia e ácido úrico foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pela diluição de 0,0360, 0,0591, 0,0600 e 0,0168 g respectivamente em etanol, em um eppendorf de 1,0 mL e, foram realizadas as diluições necessárias.

A solução de urina sintética foi preparada pela dissolução de 0,110 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,296 g de NaCl; 0,225 g de Na_2SO_4 ; 0,140 g de KH_2PO_4 ; 0,160 g de NH_4Cl e 2,5 g de ureia em um balão volumétrico de 100 mL completado com água ultrapura conforme descrito por Laube et al (2001).

Todas as vidrarias usadas passaram por um procedimento de limpeza com HNO_3 10 % v/v e posterior lavagem com água ultrapura a fim de eliminar a presença de resíduos que pudessem interferir nas medidas.

3.2 EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas utilizando uma balança analítica Marte/Shimadzu modelo AY220 com precisão de $\pm 0,01 \text{ mg}$.

As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando um pHmetro AZ86505 Bench Top Water. O banho de ultrassom utilizado foi um QUIMIS® modelo Q33502.

Para as medidas voltamétricas foi utilizado um potenciostato PalmSens 2 interfaciado a um microcomputador sendo gerenciado pelo software PStrace 5.3. Foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro com encaixe para três eletrodos: o eletrodo de trabalho, GCE, NTC/GCE ou $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NTC/GCE}$, o eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e o eletrodo auxiliar um fio de platina.

Para as medidas de MEV foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo FEI Quanta 200, com resolução de $5 \mu\text{m}$.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AD/T LPGE KIT acoplado a um detector de arranjo de diodos (Tóquio, Japão) e uma coluna C18 (Phenomenex – 250 mm x 4,5 mm) com tamanho de partículas de $5 \mu\text{m}$.

3.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO SUPORTADAS SOBRE NANOTUBOS DE CARBONO E PREPARO DO SENSOR ELETROQUÍMICO

A síntese das nanopartículas de Fe_2O_3 suportadas sobre nanotubos de carbono de paredes múltiplas (Fe_2O_3 -CNT) foi realizada pelo aluno de doutorado Vanildo Souza Leão Neto no laboratório LEMA coordenado por Luiz Henrique Dall'Antonia, a síntese foi realizada por um processo chamado *Purpose Built Materials* (material construído com propósito) (LEÃO NETO 2015).

Para essa síntese foram utilizados $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de CNT e $3,0 \text{ g}$ de Fe_2O_3 , em seguida, foram adicionados $6,0 \text{ g}$ de NaNO_3 e $0,45 \text{ g}$ de PVP (Polyvinylpyrrolidone) e o volume foi completado com 80 mL de água deionizada, a solução foi mantida sob agitação por 30 minutos. Em seguida foi selada em uma autoclave a $160 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas, o produto foi filtrado e lavado com etanol e água. Posteriormente, o produto foi seco a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ em uma estufa durante 12 horas, seguida de uma calcinação em forno mufla por 3 horas a $600 \text{ }^\circ\text{C}$ para a formação do óxido metálico.

Dois suspensões contendo Fe_2O_3 -CNT nas concentrações de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foram preparadas, às suspensões também foi adicionado o DHP (Dihexadecilhidrogenofosfato) na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para as duas suspensões, o solvente utilizado foi a água ultrapura. O DHP é um surfactante que ao dissipar-se em água por agitação ultrassônica nas concentrações ideais, produz um filme estável na superfície do eletrodo (JANEGITZ et. al. 2011). As duas suspensões foram homogeneizadas durante 2 horas em banho ultrassom e por 1 hora em agitação magnética. Posteriormente ao uso, foram armazenadas em geladeira a $\pm 4^\circ\text{C}$.

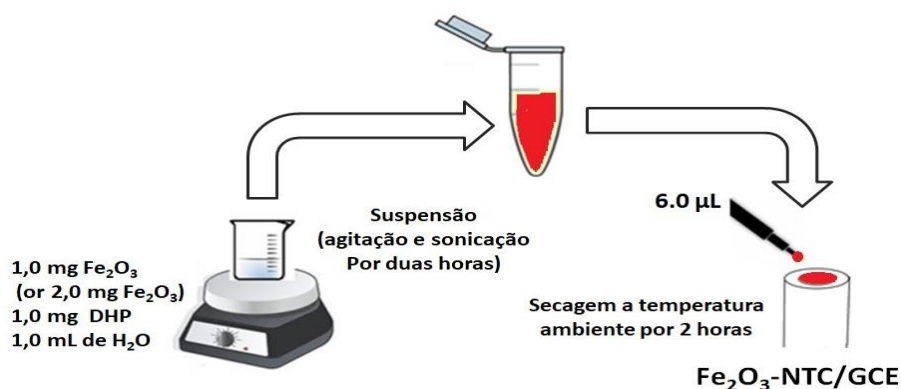
Para o eletrodo modificado apenas com CNT foi preparada uma suspensão na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de CNT, para a homogeneização da suspensão foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima para as suspensões de Fe_2O_3 -CNT.

Precedendo a modificação do CGE, foi necessário submetê-lo a um procedimento de limpeza, no qual foi realizado um polimento com uma suspensão de alumina 3,0 μm , após lavagem, foi realizado um segundo polimento com uma lixa de baixa granulometria e água. Em seguida, o eletrodo foi sonicado em banho ultrassom em 2-propanol por 5 minutos e em água purificada pelo mesmo tempo.

O condicionamento do eletrodo foi concluído com o tratamento eletroquímico, utilizando a VC na qual foram realizadas a 50 varreduras em uma faixa de potencial de -0,5 V a -1,2 V, e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} foi utilizado como eletrólito suporte.

Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta gotejou-se sobre o GCE 6,0 μL da suspensão de Fe_2O_3 -CNT. Deixando um intervalo de no mínimo 2 horas para completa secagem do solvente a temperatura ambiente. Na Figura 3 é apresentado um esquema do preparo da suspensão e modificação do GCE com Fe_2O_3 -CNT.

Figura 3 – Esquema do preparo da suspensão e modificação do GCE com Fe_2O_3 -NTC.



Fonte: Próprio autor.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ELETROANALÍTICO

Para estudos preliminares do comportamento eletroquímico do hormônio E2 na superfície do GCE foram utilizadas as técnicas VC e VOQ. Para o desenvolvimento do método eletroanalítico foi utilizada a técnica de VOQ, os parâmetros experimentais como: frequência de aplicação de pulsos de potencial (f), amplitude de pulso de potencial (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) foram avaliados. As faixas de valores estudados foram: 10 s⁻¹ a 100 s⁻¹, 10 mV a 150 mV e 1,0 mV a 12 mV, para a f , a e ΔE_s , respectivamente.

Para a construção da curva analítica foram feitas adições sucessivas da solução padrão de E2 na célula eletroquímica, contendo 20 mL solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) (10% etanol v/v). Voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após cada adição da solução padrão. A curva analítica foi realizada em triplicata.

O estudo de repetibilidade intra-dias foi realizado empregando soluções de E2 em duas concentrações diferentes, foram realizadas 10 medidas sucessivas no mesmo dia e para o estudo repetibilidade entre-dias foram realizadas 5 medidas em 5 dias diferentes e fazendo uma nova modificação no GCE.

O LD e o LQ foram calculados de acordo com as equações indicadas pela IUPAC:

$$LD = 3,3 \times \sigma/m \quad (\text{Eq. 1})$$

$$LQ = 10 \times \sigma/m \quad (\text{Eq. 2})$$

No qual, σ é desvio padrão de dez medidas da solução do branco dividido por m que é o coeficiente angular da curva analítica (LONG; WINEFORDNER, 1983).

O estudo de possíveis interferentes foi realizado nas condições experimentais estabelecidas no desenvolvimento do método eletroanalítico. As medidas voltamétricas foram realizadas adicionando o E2 e o possível

interferente na proporção de 1:10, respectivamente. Também foram realizados estudos com a mistura das substâncias encontrados nas amostras de medicamentos e na amostra de urina. Os resultados de corrente de pico obtidos foram comparados com aqueles obtidos utilizando-se apenas a solução padrão do E2. As substâncias avaliadas como interferentes foram ácido úrico (AU), lactose (LAC), ureia (U) e estearato de magnésio.

3.5 MÉTODO COMPARATIVO PARA QUANTIFICAÇÃO DO E2

O método comparativo utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV-vis. O procedimento descrito por Yilmaz et al. (2017) com algumas modificações foi utilizado para a quantificação do E2.

Uma coluna cromatográfica C18 foi utilizada como fase estacionária e como fase móvel foi utilizado uma mistura de metanol:água (70:30, v/v) com eluição no modo isocrático, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$. O comprimento de onda selecionados no detector UV-vis foi de 220 nm.

3.6 PREPARO DE AMOSTRA

A amostra de água do lago Igapó (Londrina/PR) foram coletadas em um frasco de plástico limpo e transparente e foram armazenadas em geladeira a aproximadamente 4°C . Posteriormente a amostra foi filtrada em papel de filtro e utilizada no preparo da solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,00), utilizada posteriormente, como eletrólito suporte.

Os experimentos foram feitos em triplicata, foram adicionadas alíquotas da solução padrão de E2 à amostra. A partir dos sinais de corrente obtidos, foi possível realizar os testes de adição e recuperação.

O preparo da amostra de urina sintética foi realizado conforme descrito por Laube et al (2001), foram pesados $0,110 \text{ g}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,296 \text{ g}$ de NaCl ; $0,225 \text{ g}$ de Na_2SO_4 ; $0,140 \text{ g}$ de KH_2PO_4 ; $0,160 \text{ g}$ de NH_4Cl e $2,5 \text{ g}$ de ureia, os quais foram dissolvidos em um balão volumétrico de 100 mL .

completado com água ultrapura. Posteriormente, foi adicionado à célula eletroquímica 1000,0 μL da urina sintética juntamente com o KCl 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 (10% etanol v/v), seguida da adição de alíquotas da solução padrão de E2. A partir dos sinais de corrente obtidos, foi possível realizar os testes de adição e recuperação.

No preparo das amostras de medicamentos, marcas A e B, 10 comprimidos foram pesados e macerados em um graal com auxílio de um pistilo até a formação de um pó fino e homogêneo. A massa correspondente a 1 comprimido foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 5 mL contendo etanol, diluições necessárias foram realizadas a partir desta solução.

Em seguida, alíquotas da amostra A ou B, foram transferidas para a célula eletroquímica contendo 20,0 mL do eletrólito suporte, KCl 0,1 mol L^{-1} . O método de adição de padrão foi utilizado para a determinação do E2.

Para as medidas utilizando-se a CLAE, foram pesados 10 comprimidos dos medicamentos marcas A e B, macerados e pesado a massa correspondente a 1 comprimido. Posteriormente, foram diluídos para 10,0 mL com a fase móvel (metanol:água) e foram filtradas previamente às injeções. Após o preparo das soluções, um volume de 20,0 μL foi injetado na coluna cromatográfica para a separação dos analitos e posterior detecção UV-vis em 220 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

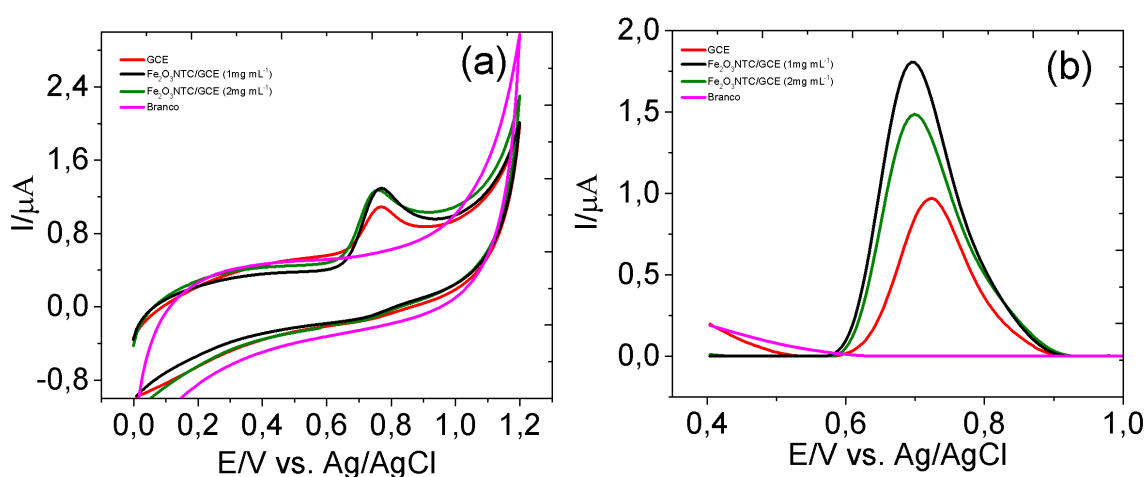
4.1 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO E2 UTILIZANDO O SENSOR $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{CNT}/\text{GCE}$

O comportamento voltamétrico do E2 foi estudado utilizando VC e VOQ em solução de KCl 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) (10% etanol v/v), foi realizada uma comparação dos voltamogramas obtidos com o GCE sem modificação, e modificado com as nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CNT}$ e DHP na proporção de 1,0 e 2,0 mg mL^{-1} .

Na Figura 4 (A) são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos. Observou-se apenas um único pico de corrente anódica em, aproximadamente, 0,8 V, ou seja, ocorre apenas um processo de oxidação para o E2 e não há pico no sentido inverso de varredura (redução), na faixa de potencial estudada, o que indica um processo irreversível, este resultado está de acordo com os reportados na literatura (SMAJADOR et al., 2017, BRAGA et al., 2018, ANTONIAZZI et al., 2017, OZCAN e TOPCUOGULLARI 2017, LAHCEN et al., 2017, ZHANG et al., 2014, AZEVEDO et al., 2013, TERUI e TANAKA 2006, HU et al 2002).

O GCE sem modificação apresentou menor intensidade de corrente de pico ($\Delta I = 0,324 \mu\text{A}$) quando comparado às obtidas com $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CNT/GCE}$ na concentração de 1,0 e 2,0 mg mL^{-1} , $\Delta I = 0,609$ e $0,508 \mu\text{A}$, respectivamente. Para complementar os dados obtidos com a VC, também foram realizadas medidas utilizando a técnica de VOQ (Figura 4(b)). Observou-se que o $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CNT/GCE}$ modificado na concentração de 1,0 mg mL^{-1} também apresentou maior intensidade de corrente. Além disso, pela VOQ foi possível observar um pequeno deslocamento de potencial para valores menos positivos, demonstrando o efeito eletrocatalítico do material utilizado.

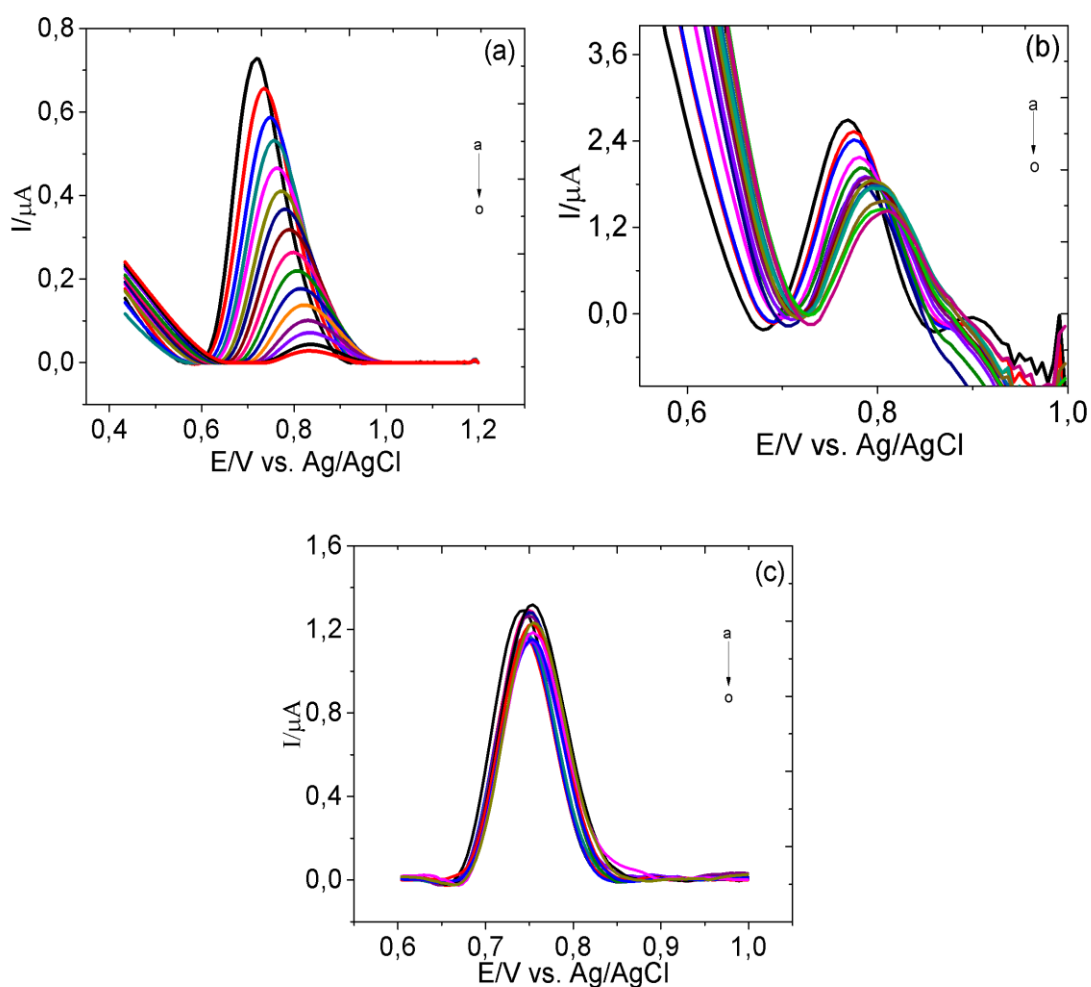
Figura 4 – (a) Voltamogramas cíclicos obtidos com (—) GCE sem modificação; Fe₂O₃-CNT/GCE (—) 1,0 mg mL⁻¹; (—) 2,0 mg mL⁻¹ e (—) Branco; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com (—) GCE sem modificação; Fe₂O₃-CNT/GCE (—) 1,0 mg mL⁻¹; (—) 2,0 mg mL⁻¹ e (—) Branco. Parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$, ambos em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo E2 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



A fim de avaliar o processo de adsorção do produto de oxidação do E2 na superfície do eletrodo, foram realizados estudos nos quais foram feitas 15 medidas consecutivas utilizando o GCE sem modificação, GCE-CNT e o Fe₂O₃-CNT/GCE em solução de E2 na concentração de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em KCl 0,1 mol L⁻¹ (10% etanol v/v). Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 5.

Na Figura 5 (a) pode-se observar que houve uma diminuição bastante significativa da intensidade de corrente de pico após as 15 medidas consecutivas, o valor da corrente de pico da primeira medida foi de 0,726 μA e da última (15^a medida) foi de 0,023 μA (última medida), apresentando um desvio padrão relativo (DPR) de 70,9%.

Figura 5 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos com (a) GCE sem modificação, (b) GCE-CNT e (c) Fe₂O₃-CNT/GCE- em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo E2 10,0 μmol L⁻¹. Parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$.



Além disso, observou-se também um deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos com o número de medidas. Esses resultados indicam que está ocorrendo uma passivação na superfície do GCE dificultando a interação deste com o E2 e conseqüentemente sua oxidação. O

mesmo comportamento foi observado com o CNT-GCE (Figura 5(b)), o DPR obtido para as medidas de intensidade de corrente de pico foi de 26,3%. Essa adsorção em ambos os eletrodos inviabilizam o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos devido à falta de precisão entre as medidas.

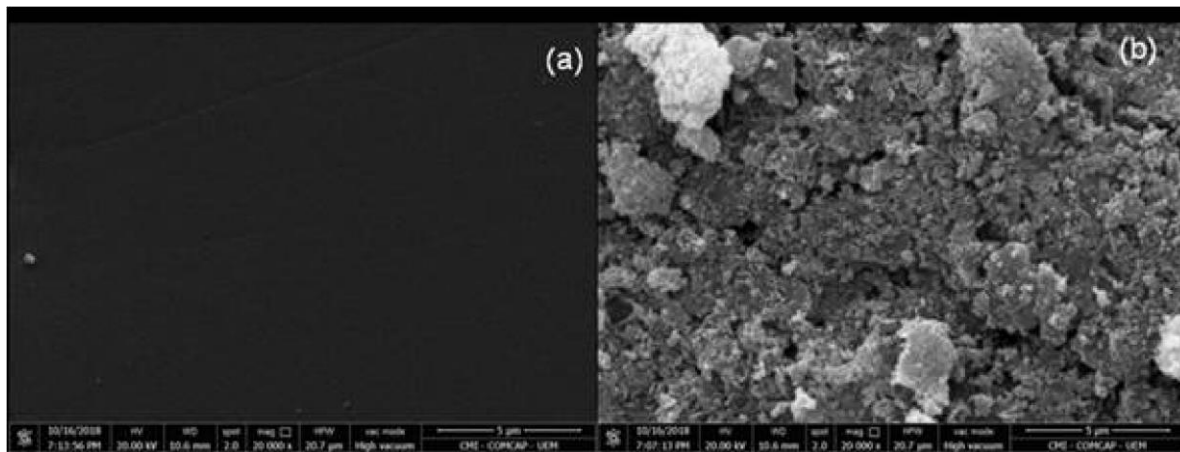
Por outro lado, os resultados nesse estudo para o Fe_2O_3 -CNT/GCE obtidos foram bastante diferentes, o DPR obtido com as 15 medidas foi de 3,7%, indicando que não há passivação da superfície do eletrodo, justificando assim a utilização do Fe_2O_3 -CNT na modificação do GCE e desenvolvimento deste sensor eletroquímico para quantificação do E2.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO Fe_2O_3 -CNT/GCE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a caracterização morfológica da superfície do GCE e do Fe_2O_3 -CNT/GCE utilizou-se a técnica de MEV. Na Figura 6 são apresentadas as imagens obtidas para o GCE (a) e Fe_2O_3 -CNT/GCE (b).

Observou-se que a modificação da superfície foi bastante homogênea, com um recobrimento total da superfície do GCE e que os CNTs estão totalmente recobertas pelas partículas de Fe_2O_3 .

Figura 6 – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para **(a)** GCE sem modificação e **(b)** modificado com Fe₂O₃-CNT..

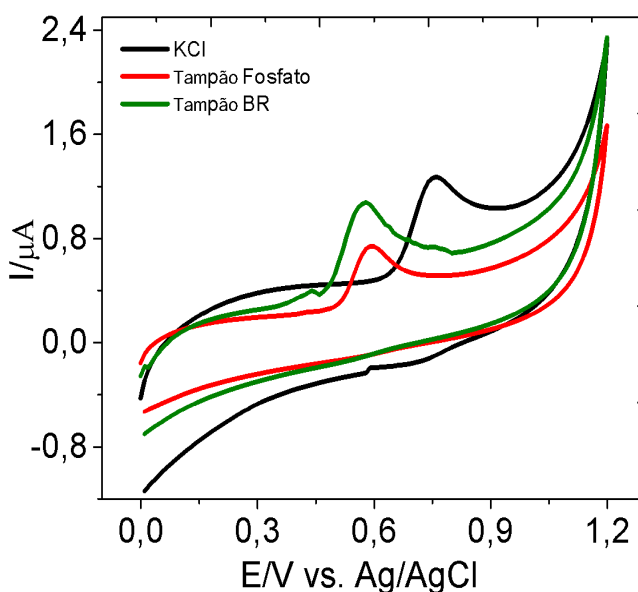


4.3 ELETRÓLITO SUPORTE E EFEITO DE PH

O eletrólito suporte e pH são variáveis que influenciam diretamente a resposta eletroquímica obtidas para o analito. Assim, diferentes eletrólitos suportes foram avaliados. Os voltamogramas obtidos para o Fe₂O₃-CNT/GCE em KCl, tampão fosfato e o tampão BR contendo E2 10,0 µmol L⁻¹ estão apresentados na Figura 7.

O eletrólito suporte que apresentou melhor definição e maior intensidade de corrente de pico de oxidação do E2 foi o KCl 0,1 mol L⁻¹ (10 % etanol v/v) pH 7,0. Os valores de intensidade de pico obtidos para KCl, tampão fosfato e o tampão BR foram 0,56, 0,43 e 0,38 µA respectivamente. Porém, o potencial de pico de oxidação obtido para o E2 no KCl foi maior do que os obtidos com os outros eletrólitos suporte, esse efeito pode estar relacionado com os diferentes íons presentes no eletrólito e como esses se adsorvem à superfície do eletrodo de trabalho, influenciando no carreamento da dupla camada elétrica e na interação do analito com o eletrodo.

Figura 7 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes eletrólitos: (—) tampão BR pH 7,0; (—) tampão fosfato pH 7,0; (—); KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo E2 10,0 μmol L⁻¹ empregando-se o Fe₂O₃-CNT/GCE; v = 100 mV s⁻¹.



O efeito da concentração hidrogeniônica do meio (pH) também foi estudado. Voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando o Fe₂O₃-CNT/GCE em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (10 % etanol v/v) em diferentes valores de pH (2, 0 – 10,0), contendo E2 10,0 μmol L⁻¹ (Figura 8).

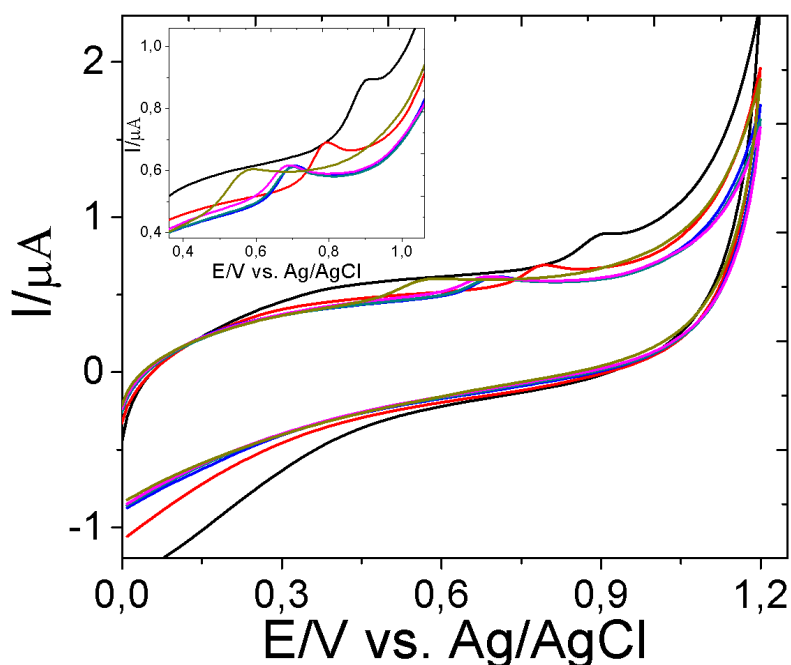
Ao analisar os voltamogramas observou-se que com o aumento da concentração hidrogeniônica, há um deslocamento para potenciais menos positivos, o que é um comportamento característico para a oxidação de compostos fenólicos de acordo com Vega et al. 2007.

Para valores de pH acima de pH 10,0, a oxidação das espécies torna-se cineticamente menos favoráveis, com isso pode ocorrer à adsorção do analito na superfície do eletrodo com mais facilidade e mais intensamente (FELIX et al., 2007), deste modo para evitar a adsorção do analito na superfície do eletrodo não foram feitas medidas em pH acima de 10,0.

Em pHs 6,0, 7,0 e 8,0 os valores das intensidades de corrente de pico foram muito parecidos 0,069, 0,072 e 0,064 μA, respectivamente, apesar

da diferença entre os pHs 6,0 e 7,0 serem pequenas, o pH 7,0 foi selecionado para as medidas posteriores, pois este além da melhor definição de pico e maior intensidade de corrente também apresentou melhor repetibilidade entre as medidas com DPR de 0,65%, para $N = 3$.

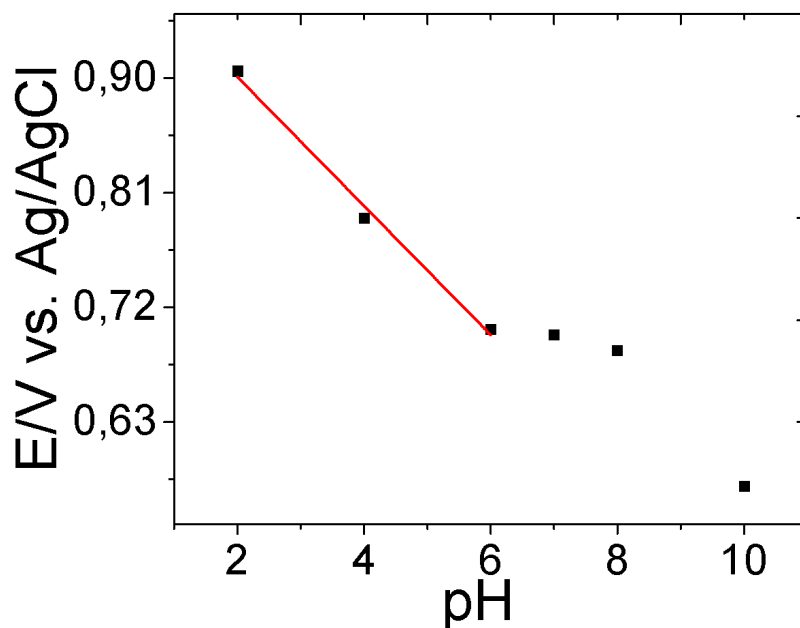
Figura 8 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações hidrogeniônicas em KCl 0,1 mol L⁻¹ (10 % etanol v/v) pH 2,0 (—); 4,0 (—); 6,0 (—); 7,0 (—); 8,0 (—) e 10,0 (—) para 10 μmol L⁻¹ de E2 utilizando o Fe₂O₃-CNT/GCE; $\nu = 100$ mV s⁻¹.



A partir desse estudo também foi possível obter um gráfico de potencial versus pH (Figura 9) onde é possível observar um comportamento linear no intervalo de pH 2,0 – 6,0. O valor do coeficiente angular obtido nesse intervalo foi de 51 mV pH⁻¹, muito próximo ao valor teórico de 59 mV pH⁻¹ (comportamento Nernstiano). Indicando um processo eletroquímico que envolve o mesmo número de prótons e elétrons durante a reação de oxidação do E2. Este resultado está de acordo com o trabalho de NGUNDI et al., 2003, que propõe que a oxidação do E2 ocorre pela transferência de números iguais

de elétrons e prótons, como também é mostrado no mecanismo proposto na seção 4.6.

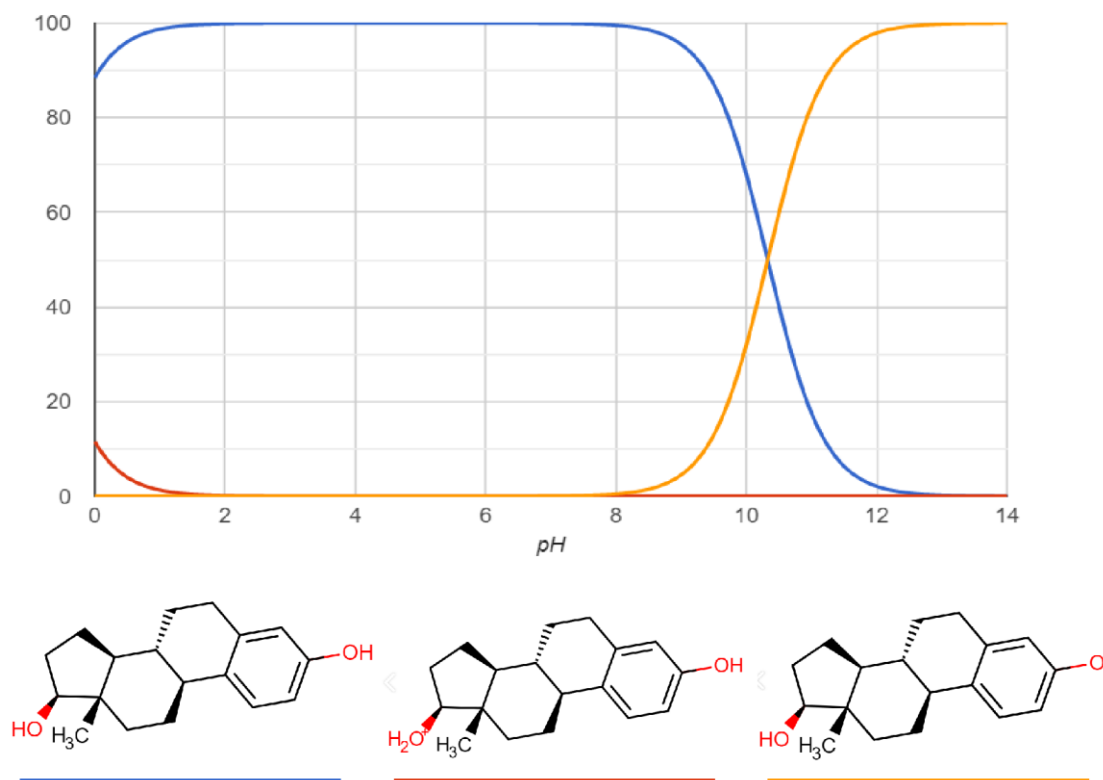
Figura 9 – Relação entre o potencial de oxidação do E2 em diferentes valores de pH



Na Figura 10 é mostrado um gráfico da distribuição das espécies de E2 de acordo com o pH. Observa-se que o pKa do E2 é de 10,33 em que este valor representa o ponto de intersecção das moléculas de E2, ou seja, neste valor as espécies de E2 estão 50% protonadas e 50% desprotonadas.

Deste modo, em pH 7,0 a molécula de E2 ainda está protonada e a superfície do eletrodo está carregada negativamente, assim há uma melhor interação entre a molécula e a superfície do eletrodo, justificando os resultados obtidos e a escolha do pH 7,0 para as medidas posteriores.

Figura 10 – Distribuição das espécies de E2 de acordo com o pH da solução.



Fonte: <https://chemicalize.com/calculation>.

4.4 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

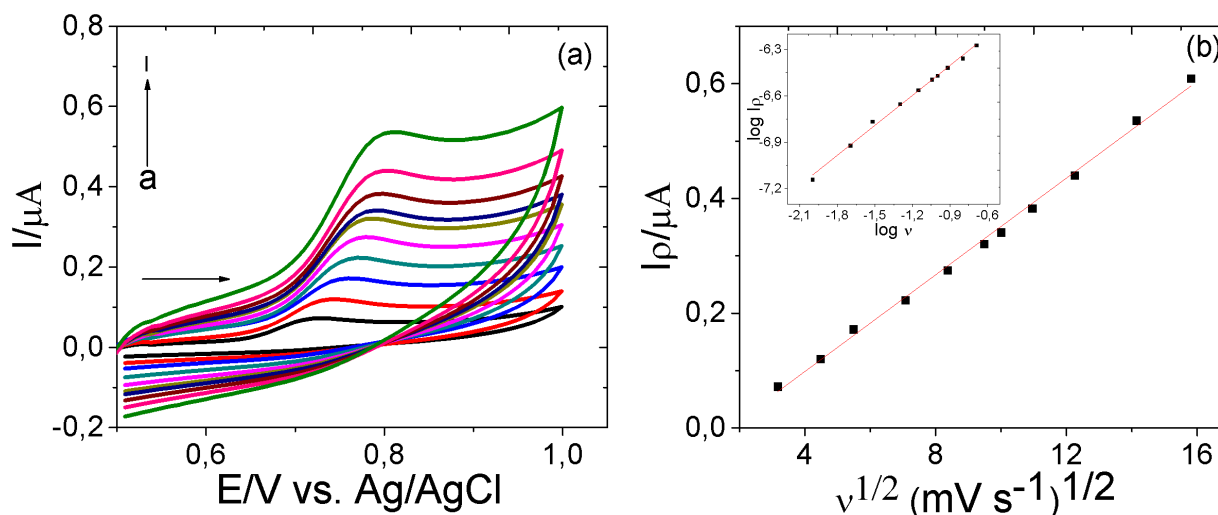
Voltamogramas cíclicos foram obtidos, em diferentes velocidades de varredura (10 - 250 mV s⁻¹), em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (10 % etanol v/v) pH 7,0 contendo E2 utilizando o Fe₂O₃-CNT/GCE, como mostrado na Figura 11 (a).

Observou-se que há um aumento na intensidade da corrente do pico à medida que a velocidade de varredura aumenta. O potencial de oxidação do E2 desloca-se para valores mais positivos, característica intrínseca de processos totalmente irreversíveis (BARD et al 2001; VEGA et al 2007; MARTINEZ et al 2012; GAN et al 2013; SMAJADOR et al 2017).

Na Figura 10 (b) são apresentados os gráficos da dependência entre a corrente de pico e a velocidade de varredura e, o gráfico inserido é o logaritmo de I_p pelo logaritmo da v para E2. Como pode ser observada a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, este comportamento é um indicativo de que a etapa determinante da velocidade da reação do E2 é controlada preferencialmente por difusão das espécies à superfície eletródica (BARD et al 2001; LORIMER et al 2004; FELIX et al 2007; GAN et al 2013; SJAMADOR et al 2017).

A relação entre o logaritmo de I_p também mostrou-se linear nessa faixa de velocidade de varredura, cuja equação obtida foi: $\log I_{pE2} = -1,715 + 0,6292 \log v$; $R^2 = 0,995$; o valor do coeficiente angular obtido está próximo do valor teórico (0,50), descrito na literatura, para sistemas controlados preferencialmente por difusão das espécies (GOSSER 1993; GARCIA et al 2007; GAN et al 2013; SJAMADOR et al 2017). Confirmando assim que o processo de transferência de carga das moléculas de E2 ocorre por difusão das espécies à superfície do Fe_2O_3 -CNT/GCE.

Figura 11 – (a) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura, a – i: 10 - 250 mV s^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} (10 % etanol v/v) pH = 7,0 contendo E2 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CNT/GCE}$. (b) Dependência da corrente de pico pela velocidade de varredura para o E2. O gráfico inserido corresponde à dependência de $\log i_p$ vs $\log v$ para o E2 s^{-1} .



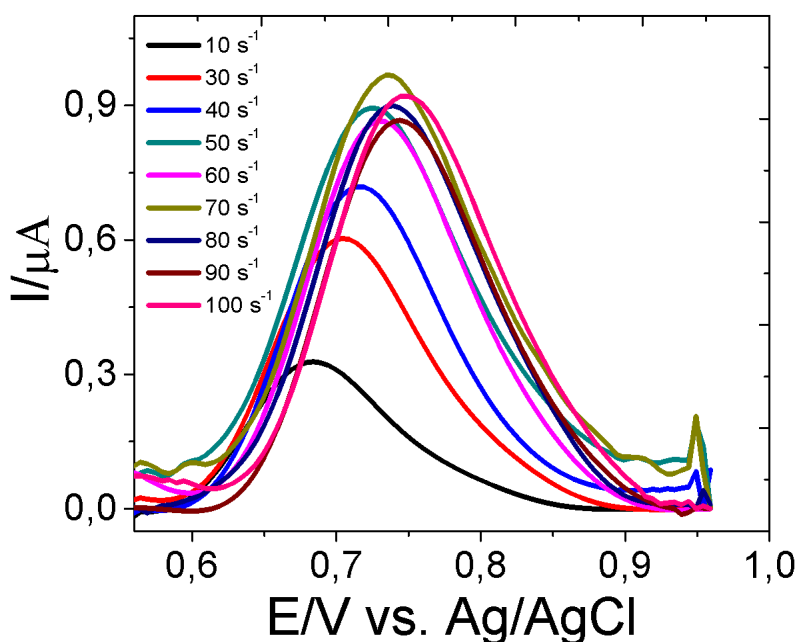
4.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

Para o desenvolvimento do método eletroanalítico é necessário a otimização de parâmetros experimentais referentes à técnica de VOQ, como a frequência de aplicação de pulsos de potencial (f), amplitude de pulso de potencial (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s), pois podem melhorar de forma substancial a resposta voltamétrica (MURRAY et al.; 1988, NUWER et al.; 1991, SOUZA et al.; 2003, MEDEIROS, 2007).

A f é uma das variáveis mais importantes na VOQ, pois ela determina a intensidade dos sinais e pode influenciar diretamente na sensibilidade do método e, também fornecer informações sobre o processo mecanístico do sistema (MEDEIROS, 2007).

Na Figura 12 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o E2 em função da variação da f . Observou-se que houve um aumento na intensidade de corrente de pico até 70 s^{-1} , após este valor ocorre uma pequena diminuição nos valores de corrente, e também é possível observar uma deformação no pico e um deslocamento para valores de potenciais mais positivos. A f igual a 60 s^{-1} apresentou boa definição de pico e maior repetibilidade entre as medidas, sendo selecionada para as medidas posteriores.

Figura 12 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes valores de frequência de aplicação dos pulsos de potencial ($10 - 100 \text{ s}^{-1}$) em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 (10% etanol v/v) contendo E2 $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; parâmetros da VOQ: $\alpha = 50,0 \text{ mV}$, $\Delta E 5,0 \text{ mV}$.

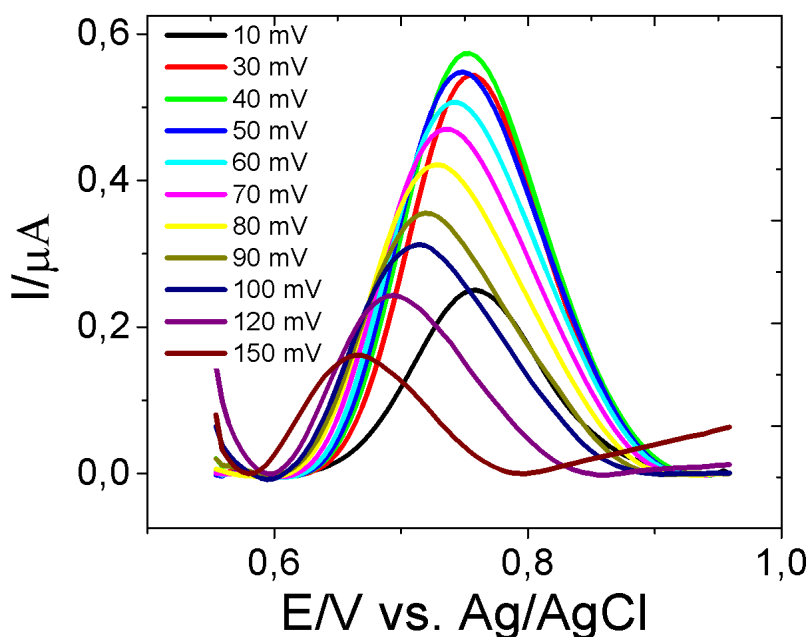


Em sistemas totalmente irreversíveis o aumento da amplitude pode deslocar os valores de potenciais, provocar mudanças nas larguras de meia-altura dos voltamogramas e pode causar um aumento da corrente de pico (SOUZA et al.; 2003, MEDEIROS, 2007).

Os voltamogramas obtidos para diferentes valores de amplitude para o E2 estão apresentados na Figura 13, observou-se que para valores de amplitude até 40 mV a corrente de pico aumenta e acima desse valor a corrente de pico diminui e ocorre um deslocamento para valores de potenciais menos positivos.

Deste modo o valor de amplitude escolhido para posteriores medidas foi de 40 mV, por apresentar maior intensidade de corrente e boa definição do pico de corrente.

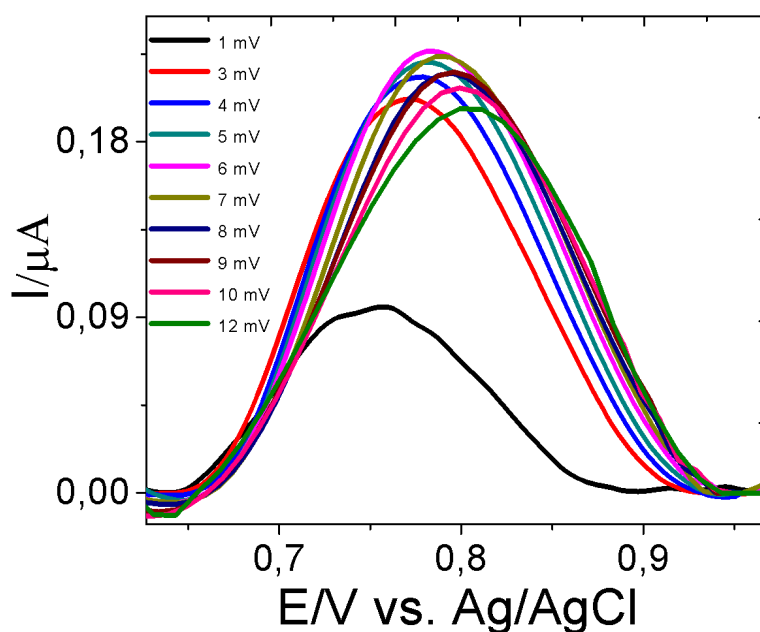
Figura 13 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes valores de amplitude de pulso de potencial (10 – 150 mV), em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 (10% etanol v/v) contendo E2 5,0 μmol L⁻¹; parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E = 5,0 \text{ mV}$.



O efeito do ΔE_s também foi avaliado, valores altos podem aumentar o sinal de corrente obtido e, conseqüentemente, melhorar a sensibilidade do método, porém maiores incrementos podem acarretar em alargamentos dos picos e assim a resolução pode ser afetada (NUWER et al.; 1991, SOUZA et al.; 2003, MEDEIROS, 2007).

A Figura 14 mostra os voltamogramas obtidos variando ΔE_s para o E2. Observa-se que até o valor de 6 mV a corrente de pico aumenta e em valores maiores ocorre um decaimento na intensidade do pico. Assim, este valor de 6 mV foi escolhido para as demais medidas pois apresentou maior intensidade de corrente.

Figura 14 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes valores de incremento de varredura (1 – 12 mV) em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ pH = 7 (10% etanol v/v) contendo E2 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 40 \text{ mV}$,



4.6 MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO E2

Por meio dos voltamogramas cíclicos obtido em diferentes velocidades de varredura (Figura 11) foi possível determinar o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação da molécula de E2 por meio da

Equação 3, desenvolvida para sistemas totalmente irreversíveis (GOSSER, 1993; BARD et al., 2001).

$$|E_p - E_{p/2}| = 47,7 \text{ mV} / \alpha n \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo E_p o potencial de pico anódico; $E_{p/2}$ o potencial relacionado a metade do valor da corrente para E_p ; α representa o coeficiente de transferência de carga (0,50), valor utilizado para moléculas orgânicas e, n é o número de elétrons. Para o E2 os valores médios de E_p e $E_{p/2}$ cujas as médias foram 0,769 e 0,709 V, respectivamente. O valor de n obtido para a oxidação do E2 na superfície do $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-CNT/GCE}$ foi igual a 1,6 elétrons.

A técnica de VOQ também permite estudar os processos redox que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho, e estimar, por exemplo, o número de elétrons envolvidos na reação.

O número de elétrons, para processos irreversíveis, pode ser calculado utilizando a equação Eq.4. (SOUZA et al.; 2003, MEDEIROS, 2007).

$$\delta E_p / \delta \log f = -2.3RT / \alpha nF \quad (\text{Eq.4})$$

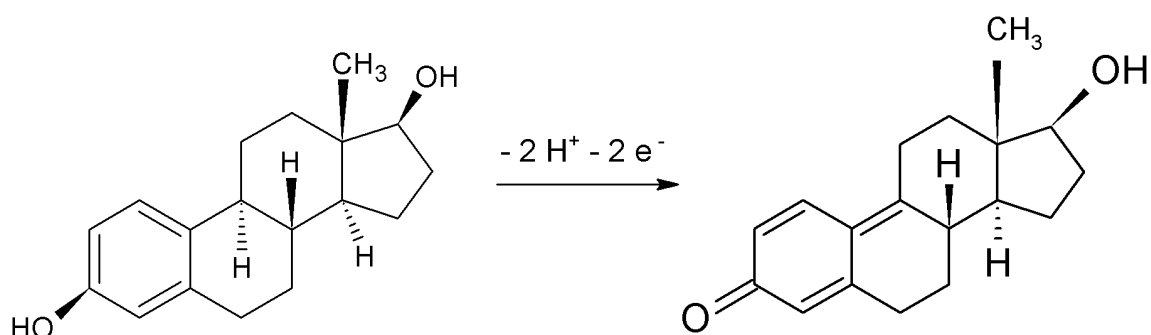
Na qual, α é o coeficiente de transferência de carga, que para moléculas orgânicas segundo a literatura é de 0,5, n é o número de elétrons envolvidos na reação do E2 e $\delta E_p / \delta \log f$ é o coeficiente angular obtido da dependência do potencial redox pelo logaritmo das frequências de aplicação de pulsos de potencial.

O coeficiente angular obtido para o E2 foi 0,069, aplicando esses valores na equação 4, o número de elétrons obtido foi de 1,6. O número de elétrons obtidos pelas duas técnicas, próximo a 2 elétrons, são concordantes com os mecanismos propostos na literatura para oxidação eletroquímica do E2. De acordo NGUNDI et al. (2003), a oxidação inicial do estradiol produz um radical fenoxi, este é ainda oxidado a um íon fenoxônio, seguido por uma

reação química, para formar uma cetona. O mecanismo de reação de oxidação eletroquímica do E2 de acordo com a literatura está apresentado na Figura 15.

Comumente, a oxidação de moléculas fenólicas não dissociadas envolve a transferência de dois elétrons e a oxidação de moléculas dissociadas (fenolatos) envolve apenas um elétron (BROCENSCHI et al 2014).

Figura 15 – Proposta de mecanismo para a reação de oxidação eletroquímica do E2 sobre a superfície do Fe₂O₃-CNT/GCE.



Fonte: Próprio autor, adaptado de (NGUNDI et al., 2003).

4.7 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Após a otimização dos parâmetros da VOQ, foram realizados experimentos para a construção da curva analítica, pela adição de alíquotas de uma solução contendo E2 em diferentes concentrações, em uma cela eletroquímica contendo 20 mL de KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 (10% etanol v/v). Os voltamogramas obtidos e a curva analítica são apresentados na Figura 16 (a).

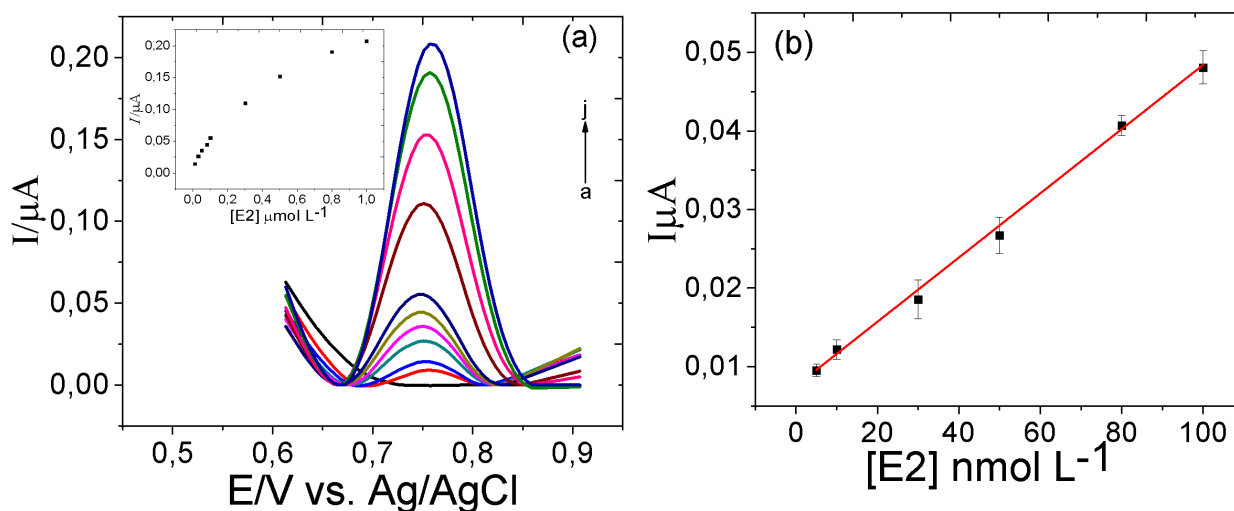
Por meio dos sinais obtidos nos voltamogramas foi construída a curva analítica para o E2 como mostra a Figura 16 (b).

A curva analítica apresentou intervalo linear de concentração entre 5,0 e 100,0 nmol L⁻¹. A equação da regressão linear obtida está apresentada na Eq. 5.

$$I_{E2} / \mu A = 0,0072 + 0,4083 [E2 (\mu mol L^{-1})] \quad (R^2 = 0,998) \quad (Eq. 5)$$

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram 4,39 nmol L⁻¹ e 14,6 nmol L⁻¹, respectivamente.

Figura 16 – (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com Fe₂O₃-CNT/GCE em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 (10% etanol v/v) contendo E2 em diferentes concentrações de E2: (a – j) 0,005; 0,01; 0,03; 0,05; 0,08; 0,10; 0,30; 0,50; 0,80 e 1,0 μmol L⁻¹; (b) Curva analítica obtida para o E2 no intervalo de concentração 5,0 e 100,0 nmol L⁻¹ (faixa linear). Parâmetros da VOQ: $f = 60 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta ES = 6 \text{ mV}$. (N = 3).



Na Tabela 2 são apresentadas comparações entre os limites de detecção e faixa linear de concentração obtidos com o método proposto, e com outros métodos eletroanalíticos descritos na literatura para a determinação de E2.

Braga e colaboradores (2018) e Lahcen e colaboradores (2017) utilizaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com MIP para a determinação de E2, o que requer um longo tempo para a polimerização molecular, assim como para a modificação do eletrodo.

Smajador e colaboradores (2018) empregaram o GCE modificado com negro de fumo para determinar E2, utilizando a técnica DPV acoplado ao

sistema FIA, o método utilizado necessitou de uma pré-concentração do analito (5 min), isto aumenta o tempo de análise e conseqüentemente a frequência analítica do método.

Azevedo e colaboradores (2013) utilizaram um eletrodo de ouro modificado com MIP, para determinação de E2, empregando a técnica VC, além do custo relativamente alto do eletrodo de ouro, o método necessitou de um longo tempo de preparo da polimerização e modificação deste eletrodo.

Terui e colaboradores (2013), assim como neste trabalho utilizaram o GCE modificado com CNT e a técnica VOQ, para a determinação de E2. Entretanto os autores fizeram uma pré-concentração no eletrodo por 5 min, o que diminui a frequência analítica e o tempo de preparo do eletrodo foi relativamente demorado cerca de 10 horas.

Ademais, todos os trabalhos supracitados apresentaram uma faixa linear de concentração e um LD superiores aos valores obtidos neste trabalho. Dessa forma, o método proposto utilizando um Fe₂O₃-CNT/GCE e a VOQ, mostra-se como alternativa eficaz para a determinação rápida do E2 sem necessidade de pré-concentração.

O método descrito por Lahcen et al. (2017) apresenta um LD (0,002 µmol L⁻¹) inferior ao obtido neste trabalho, porém a concentração inicial da faixa linear é 10 vezes maior do que a do método proposto, indicando que com este método é possível quantificar concentrações menores quando comparado a método de Lahcen et al.

Tabela 2 - Parâmetros analíticos obtidos para a determinação do E2 pelo método proposto e por outros trabalhos descritos na literatura

Técnica	Intervalo linear de concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD (μmol^{-1})	Características Analíticas	Referência
DPAdSV	0,16 – 15	0,027	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrodo de pasta de carbono; • Polimerização molecular • Longo tempo de preparo e modificação do eletrodo. 	(BRAGA et al., 2018)
DPV-FIA	1 – 12	0,092	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrodo de carbono vítreo • Modificação com negro de fumo • Pré-concentração do analito (5 min). 	(SMAJADOR et al., 2018)
VC	0,1 – 0,8	0,689	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrodo de ouro • Longo tempo na preparação do eletrodo • Polimerização molecular 	(AZEVEDO et al., 2013)
VOQ	0,25 – 1	0,01	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrodo de carbono vítreo modificado com CNT • Pré-concentração do eletrodo. 	(TERUI et al., 2013)
VOQ	0,05 – 10	0,002	<ul style="list-style-type: none"> • Eletrodo de pasta de carbono • Polimerização molecular • Longo tempo de preparo e modificação do eletrodo. 	(LAHCEN et al., 2017)

VOQ	0,005 – 0,1	0,004	<ul style="list-style-type: none">• Eletrodo de carbono vítreo modificado com Fe₂O₃-CNT• Sem necessidade de tratamento das amostras• Tempo rápido de análise• Sem necessidade de pré-concentração do analito	Este trabalho
-----	-------------	-------	---	---------------

Também foram realizados estudos de repetibilidade intra-dias e entre-dias, como descrito na seção 3.4. Os desvios padrões relativos (DPR) calculados estão apresentados na Tabela 3.

Os valores de DPR obtidos mostram que houve uma baixa adsorção do produto da oxidação do E2 na superfície do Fe₂O₃-CNT/GCE. Tais resultados demonstram a boa precisão e eficiência da modificação considerando que, como mostrado anteriormente, com o GCE puro e CNT/GCE essa adsorção foi muito significativa inviabilizando o uso destes para a quantificação do E2.

Tabela 3 – Desvios Padrão Relativos obtidos no estudo de repetibilidade intra-dias e entre-dias para o E2 utilizando o Fe₂O₃-CNT/GCE.

E2 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	intra-dias DPR ^a (%)	entre-dias DPR ^b (%)
0,01	4,8	8,6
0,05	3,8	5,7

^a(n=10); ^b(n=5)

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO E2 EM AMOSTRA DE MEDICAMENTOS, ÁGUA DO LAGO IGAPÓ E URINA SINTÉTICA UTILIZANDO O MÉTODO PROPOSTO

Para investigar a seletividade do método proposto, algumas substâncias, geralmente, presente nos medicamentos e urina foram avaliadas (seção 3.4) como possíveis interferentes. As substâncias analisadas foram ácido úrico (AU), lactose (LAC), uréia (U) e estearato de magnésio (EM), assim como descrito no procedimento experimental seção 3.4. Os valores dos erros relativos obtidos entre as medidas voltamétricas para o E2 na ausência e presença do possível interferente estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Desvio padrão relativo obtidos nos estudos de interferentes na proporção de 1:10 (E2:interferente).

Interferente	Erro Relativo(%)
Ácido Úrico	-1,80
Lactose	3,22
Ureia	-2,89
EM	-2,79
AU:U	-1,50
LAC:EM	-2,94

Observou-se que tais substâncias não causaram interferência significativa na resposta eletroquímica obtida para o E2, visto que os erros relativos foram menores que 3,5%, para todas as amostras.

Em amostras biológicas e ambientais, como nas amostras de águas e urina, pode haver a presença de outros hormônios estrogênicos, como o estradiol, estrona e estriol (BROCENSCHI et al. 2014), todos esses estrogênios se oxidam na mesma região de potencial do E2, deste modo, certamente irão interferir na determinação deste. Neste caso, seria possível realizar uma quantificação dos estrogênios totais e não apenas do E2.

O método desenvolvido foi utilizando nos estudos de adição e recuperação em amostras de água do lago Igapó de Londrina-PR e urina sintética. A Tabela 5 mostra os resultados de recuperação obtidos.

As recuperações das amostras foram de 105,2 e 100,4%, respectivamente, indicando que o método proposto pode ser utilizado para a quantificação de E2 em amostras de água ou de urina real que contenham o E2 sem que haja interferência significativa de suas matrizes.

Tabela 5 – Resultados obtidos para os estudos de adição e recuperação para o E2 em amostras ambientais e biológicas, utilizando o eletrodo Fe₂O₃-CNT/GCE.

Amostra	Adc. ^a (μmol L ⁻¹)	Rec. ^b (μmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
Água Lago Igapó	0,050	0,052 ± 0,005	105
Urina Sintética	0,050	0,050 ± 0,007	100

^a Valor Adicionado

^b Valor recuperado

(n = 3)

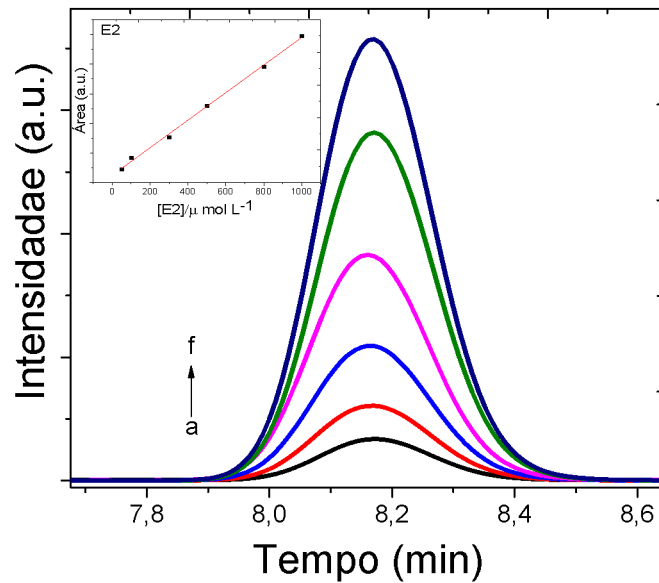
A CLAE foi utilizada como método comparativo ao método proposto na determinação de E2 em amostras de medicamentos. Nas condições experimentais descritas (seção 3.5), o E2 apresentou tempo de retenção de 8,20 min. Os cromatogramas e a curva analítica obtida estão apresentados na Figura 17. A faixa de concentração linear foi de 30 a 1000 μmol L⁻¹ e a equação da curva analítica obtida foi:

$$A \text{ (a.u.)} = 142753,1 + 2,14 \times 10^{-9} [\text{E2 } (\mu\text{mol L}^{-1})] \quad (R^2 = 0,998) \quad (\text{Eq. 5})$$

Observou-se que a faixa de concentração linear obtida pelo método eletroanalítico proposto apresenta concentrações menores (5,0 e 100,0 nmol L⁻¹) que à obtidas pelo método de CLAE. Portanto, apesar do método proposto não apresentar a vantagem da separação seguida da quantificação, é possível quantificar o E2 em amostras que apresentem concentrações na ordem de nmol L⁻¹ enquanto que com o método CLAE apenas na ordem de μmol L⁻¹.

Considerando que em amostras de águas e urina as concentrações de E2 podem ser muito baixas o método proposto apresenta-se vantajoso para esse tipo de análise, sem a necessidade da inserção de uma etapa de pré-concentração.

Figura 17 – Cromatogramas obtidos para o E2 (a – f): 30, 50, 100, 300, 500, 800 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($t = 8,20$ min; $\lambda = 220$ nm), fase móvel metanol/água (70:30 v/v) e vazão de 1,0 mL min^{-1} , em coluna C18. Gráfico inserido: Curva analítica obtida para o E2 na faixa de concentração de 30 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



As dosagens de E2 nos medicamentos marcas A e B são de 1,0 e 2,0 mg, respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6. Ressalta-se que para o método proposto as quantificações de E2 foram realizadas com tratamento simples das amostras (apenas a dissolução em etanol e diluição em solução de KCl 0,1 mol L^{-1} pH = 7 (10% etanol v/v)).

Tabela 6 – Resultados obtidos na determinação de E2 em amostras de medicamentos, utilizando o eletrodo Fe₂O₃-CNT/GCE.

Amostra	Quantidade (mg comprimido ⁻¹) ^a			
	Rotulado	CLAE	VOQ	Erro relativo (%)
A	1,0	0,96±0,02	0,95±0,05	1,04
B	2,0	1,83±0,03	1,81±0,02	1,09

^a Média de 3 medidas (n = 3)

^b Erro (%) = 100 × (resultado VOQ – resultado CLAE) / resultado CLAE

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois métodos, aplicou-se o teste *t* de *student*. O valor de *t* calculado para as amostras A e B foram iguais a 1,17 e 1,60, respectivamente. Sendo o valor crítico de *t* tabelado igual a 2,78 considera-se que o método proposto, utilizado VOQ, e o método comparativo, empregando-se a CLAE, não apresentaram diferenças significativas a um nível de confiança de 95%.

Desta maneira, o procedimento eletroanalítico desenvolvido se mostrou simples, rápido e eficaz para a determinação de E2, com a possibilidade de realizar-se a quantificação deste em amostras farmacêuticas, biológicas e ambientais considerando seu baixo LD e LQ. Ademais, apresentou vantagens como menor consumo de reagentes, a não utilização de solventes orgânicos, boa frequência analítica e baixo custo relativo quando comparado a outras técnicas analíticas.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um procedimento eletroanalítico utilizando um GCE modificado com nanopartículas de Fe_2O_3 suportadas sobre CNTs utilizando a técnica VOQ para a determinação de E2 em amostras de medicamentos, e também estudos de adição e recuperação em amostras de água do lago Igapó e urina sintética.

Foram obtidos baixos LD e 4,39 e 14,6 nmol L^{-1} , respectivamente, mostrando a viabilidade de se utilizar o método para quantificação do E2 em amostras ambientais e biológicas, que geralmente, apresentam baixas concentrações dessa substância. O procedimento também apresentou boa precisão nos estudos realizados em diferentes concentrações.

A exatidão do método proposto foi avaliada através da quantificação do E2 em amostras de medicamentos e dos estudos de adição e recuperação do E2 em amostras de água do lago Igapó e urina sintética, os resultados obtidos foram satisfatórios, concordantes com os obtidos pelo método comparativo (CLAE) e, pelas recuperações indicaram a baixa interferência da matriz das amostras na determinação desse hormônio e a viabilidade da análise de amostras reais que os contenham.

Entre as vantagens apresentadas pelo método proposto comparado aos demais métodos encontrados na literatura e o método comparativo (CLAE), destacam-se o baixo custo relativo, simplicidade na realização das análises, dispensa etapas laboriosas de preparo das amostras, alta precisão dos resultados e baixa geração de resíduos.

Portanto, diante desses resultados pode-se concluir que o procedimento eletroanalítico desenvolvido pode ser viável para ser utilizado no controle de qualidade do E2 em medicamentos, e no monitoramento de estrogênios totais em amostras biológicas como a urina e, ambientais como amostras de água.

REFERÊNCIAS

American Association for Clinical Chemistry, **Estrogens**, <<https://labtestsonline.org/understanding/analytes/estrogen/tab/test/>>, acessado em 07 de janeiro 2018.

AJAYAN, P.M., Nanotubes from Carbo, **Chem. Rev.**, 99: 1787, 1999.

ANTONIAZZI, C.; De LIMA, C.A.; MARANGONI, R.; SPINELLI, R. Voltammetric determination of 17 β -estradiol in human urine and buttermilk samples using a simple copper (II) oxide-modified carbon paste electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, p. 1373 – 1383, 2018.

ATTA, F.N.; AHMED, Y.M.; BINSABT, M. H.; GALAL, A. Hematite Nanoparticles/Ionic Liquid Crystal/Graphene–Based Nanocomposite Electrochemical Sensor for Sensitive Determination of Antipsychotic Drug. **Journal of the Electrochemical Society**, v.163, p. B659 – B666, 2016.

AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; TYAGI, R.D.; ADAMS, C.D.; SURAMPALLI, R.Y. Endocrine disrupting compounds removal from waster water, a new challenge. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 525-539, 2006.

AYAN, P.M. Nanotubes from Carbon. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 1787 - 1800, 1999.

AZEVEDO, S.D.; LAKSHMI, D.; CHIANELLA, I.; WHITCOMBE, J.M.; KARIM, K.; IVANOVA-MITSEVA, K.P.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, A.S. Molecularly Imprinted Polymer-Hybrid Electrochemical Sensor for the Detection of β -Estradiol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 13917 – 13923, 2013.

BALA, K.; SHARMA, D.; GUPTA, N. Carbon-Nanotube-Based Materials for Electrochemical Sensing of the Neurotransmitter Dopamine. **Chemelectrochem**, v.6, p. 274-288, 2019.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R.; YORK, N.; BULLET, C.; BRISBANE, W.; TORONTO, S.E. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

BATCHELOR-MCAULEY, C.; KATELHON, E.; BARNES, E.O.; COMPTON, G.R.; LABORA, E.; MOLINA, A. Recent Advances in Voltammetry. **Chemistryopen**, v. 4 p. 224 – 260, 2015.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BOVIER, T.F.; ROSSI, S.; MITA, D.G.; DIGILIO, F.A. Effects of the synthetic estrogen 17- α -ethinylestradiol on *Drosophila melanogaster*. Dose and gender dependence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162 p. 625-632, 2018.

BRAGA, G.B.; FERREIRA, O.A.F.; PEREIRA, A.C. Total Determination of Estrogenic Phenolic Compounds in River Water Using a Sensor Based on Reduced Graphene Oxide and Molecularly Imprinted Polymer. **Electroanalysis**, v. 30, p. 2176 – 2184, 2018.

BRASIL, M. S. Farmacopéia brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 2, p.938, 2010.

BRASIL, M.M.A. **Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA**. Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011 <http://www.labbb.com.br/wp-content/pdf/Resolucao_CONAMA_430_11.pdf> acessado em 13 de fevereiro de 2019.

BROCENSCHI, R. F.; ROCHA-FLHO, R. C.; DURAN, B. & SWAIN, G. M. The analysis of estrogenic compounds by flow injection analysis with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 126, p. 12-19, 2014.

CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S.E.; GREEN, F.B; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W.T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1265-1280, 2006.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J.M.; LLOMPART, M.; GARCIA-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GOMEZ, M.; TERNES, T. Behavior of Pharmaceuticals, Cosmetics and Hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, p. 2918, 2004.

CESEN, M.; HEATH, E. Disk-Based Solid Phase Extraction for the Determination of Diclofenac and Steroidal Estrogens E1, E2 and EE2 Listed in the WFD Watch List by GC-MS. **Science of the Total Environment**, v. 590, p. 832 – 837, 2017.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, Fate and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

DUGHERI, S.; PALI, L.; BOSSI, C.; et. al. Development of an Automated LC-MS/MS Method for the Determination of Eighty Pharmaceutical Compounds in Wastewater. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, p. 6394 – 6402, 2018.

ELMLINGER, M.W.; KUHNEL, W.; RANKE, M.B. Reference ranges for serum concentrations of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**, v. 40, p. 1151 – 1160, 2002.

FELIX, F.S.; BRETT, C.M.A.; ANGNES, L. Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1622-1627, 2007.

FERNANDES, N.A.; GIOVANELA, M.; ALMEIDA, C.A.P.; ESTEVES, I.V.; SIERRA, M.M.D.; GRASSI, M.T. Remoção dos hormônios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Química nova**, v.34, n.9, p. 1526-1533, 2012.

FERREIRA, O. P. **Nanotubos de carbono: preparação e caracterização**. Laboratório de química do estado sólido – UNICAMP - Monografia, p. 38, 2003.

FILHO, R. W.; ARAUJO, J. C.; VIEIRA, E. M., Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

GAN, P.; COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. The voltammetry and electroanalysis of some estrogenic compounds at modified Diamond electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2423-2434, 2013.

GAO, C.; GUO, Z.; LIU, J.H.; HUANG, X.J. The new age of carbon nanotubes: Na updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensor. **Nanoscale**, v. 4, p. 1948-1963, 2012.

GARCIA, A.F.; ROLLEMBER, M. C. Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1592-1596, 2007.

GOODING, J.J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. **Electrochimica Acta**, v.50, p. 3049-3060, 2005.

GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993.

HAO, G.; ZHENG, D.; GAN, T.; HU, C.; HU, S. Development and application of estradiol sensor based on layer-by-layer assembling technique, **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 6:1, p. 3 – 28, 2011.

HARRAZ, F.A.; ISMAIL, A.A.; AL-SAYARI, S.A.; AL-HAJRY, A.; AL-ASSIRI, M.S. Highly sensitive amperometric hydrazine sensor based on novel α -Fe₂O₃/crosslinked

polyaniline nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 234, p. 573–582, 2016.

HENRIQUES, A.B.; PERES, E.C.A.; ARAUJO, A.C.; ALMEIDA, M.T. Caracterização De Hematita E Estudo Do Potencial Zeta. **Revista Escola de Minas** v. 62.1 p. 15-22, 2009.

HU, L.; CHENG, Q.; CHEN, D.; MA, M.; WU, K. Liquid-phase exfoliated graphene as highly-sensitive sensor for simultaneous determination of endocrine disruptors: diethylstilbestrol and estradiol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 157–163, 2015.

HU, S.; WU, K.; YI, H.; CUI, D. Voltammetric behavior and determination of estrogens at Nafion-modified glassy carbon electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. **Analytica Chimica Acta**, v. 464, p. 209 – 216, 2002.

HUCZKO, A. Synthesis of aligned carbon nanotubes. **Applied Physics A**, v. 74, p. 617 - 638, 2002.

JANEGITZ, B.C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; BRETT, C.M.A.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dohexadecylphosphate film. **Sensors and Actuator B: Chemical**. [S.I.] v. 158, n.1, p. 411-417, novembro 2011.

JING, A.N.; JI-PING, L.I.; CHEN, W.; YANG, C.; HU, F.; WANG, C. Electrochemical Study and Application on Shikonin at poly (diallyldi methylammonium chloride) Functionalized Graphene Sheets Modified Glass Carbon Electrode. **Chem. Res. Chin. Univ**, v. 29 (4), p. 798-805, 2013.

JOHNSON, A.C.; WILLIAMS, R.J. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone and ethinylestradiol at sewage treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 3649-3658, 2004.

JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T.; RICHLE, P.R.; SIEGRIST, H. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 3047-3055, 2004.

KAZICI, C.H. Development of an ultra-sensitive method using nafion on a multi-walled carbon nanotube coated glassy carbon electrode for atenolol determination. **Pamukkale Univ. Muh Bilim Derg**, v. 24 (7), p. 1287-1292, 2018.

KHOSHNEVISAN, K.; MALEKI, H.; HONARVARFARD, E.; BAHARIFAR, H.; GHOLAMI, M.; FARIDBOD, F.; LARIJANI, B.; MAJIDI, R.F.; KHORRAMIZADEH, M.R. Nanomaterial based electrochemical sensing of the biomarker serotonin: A comprehensive review. **Microchimica Acta**, v.186, n.49, p.1-21, 2019.

KOH, Y. K. K.; CHIU, T. Y.; BOOBIS, A.; CARTMELL, E.; SCRIMSHAW, M.D.; LESTER, J.N. Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. **Environmental technology**, v. 29, n. 3, p. 245–267, 2008.

KUPCOVA, E.; REIFFOVA, K.; BAZEL, Y. Thin-Layer Chromatography: An Efficient Technique for the Optimization of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **Acta Chimica Slovenica**, v. 65, p. 388 – 393, 2018.

LAHCEN, A.A.; BALEG, A.A.; BAKER, P.; IWUOHA, E.; AMINE, A. Synthesis and electrochemical characterization of nanostructured magnetic molecularly imprinted polymers for 17- β -Estradiol determination. **Sensor and Actuators B-Chemical**, v. 241, p. 698 – 705, 2017.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. *Journal of Crystal Growth*, v. 223, p. 367-374, 2001

NETO LEÃO, V.S. **Síntese e Caracterização do eletrodo de α -Fe₂O₃/rGO para Aplicação em Fotoeletrocatalise**. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

LEE, S.; OH, J.; KIM, D.; PIAO, Y. A sensitive electrochemical sensor using an iron oxide/graphene composite for the simultaneous detection of heavy metal ions. **Talanta**, v. 160, p. 528-536, 2016.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, p. 631 – 681, 2003.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection a closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, v. 55, n. 7, p.712A – 724A, Jun. 1983

LORIMER, J.P.; MASON, T.J.; PLATTES, M.; WALTON, D.J. Passivation phenomena during sonovoltammetric studies on copper in strongly alkaline solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 568, p. 379-390, 2004.

MURRAY, R.W.; LOVRIC, M.; LOVRIC-KOMORSKY, S.; Adsorption Effects in Square-wave Voltammetry of Totally Irreversible redox reactions. **Electrochimica Acta**, v. 33, n.6, p. 739-744, 1988.

MA, L.; YATES, S.R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 640-641, p. 529-542, 2018.

MARTÍNEZ, N.A.; PEREIRA, S.V.; BERTOLINO, F.A.; SCHNEIDER, R.J.; MESSINA, G.A.; RABA, J. Electrochemical detection of powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 723, p. 27-32, 2012.

MEDEIROS, R. A. **Determinação Voltamétrica de Aspartame e Ciclamato de Sódio em Produtos Dietéticos Empregando um Eletrodo de Diamante Dopado com Boro**. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2007.

MERIB, J.; SPUDEIT, D.A.; CORAZZA, G.; CARASEK, E.; ANDERSON, J.L. Magnetic ionic liquids as versatile extraction phases for the rapid determination of estrogens in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 4689 – 4699, 2018.

MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PÉREZ, B.; VALLE, del M.; ALEGRETE, S. New materials for electrochemical sensing VI: carbon nanotubes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 826 - 838, 2005.

MNGUNI, S.B.; SCHOEMAN, C.; MARAIS, S.S.; CUKROWSKA, E.; CHIMUKA, L. Determination of oestrogen hormones in raw and treated water samples by reverse phase ultra-fast liquid chromatography mass spectrometry – a case study in Johannesburg South, South Africa. **Water AS**, v. 44, p. 111 – 117, 2018.

NGUNDI, M.M.; SADIK, O. A.; YAMAGUCHI, T.; SUYE, S. First comparative reaction mechanisms of b-estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. **Electrochemistry Communications**, v. 5 p. 61–67, 2003.

NIKOLAOU, A. Pharmaceuticals and related compounds as emerging pollutants in water: analytical aspects. **Global Nest Journal**, v. 15, n.1, p. 1-12, 2013.

NUWER, M.J.; O´DEA, J.J.; OSTERYOUNG, J. Analytical and Kinetic investigations of totally irreversible electron transfer reactions by square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 251, p. 13-25, 1991.

OZCAN, A.; TOPCUOGULLARI, D. Voltammetric determination of 17- β -estradiol by cysteamine self-assembled gold nanoparticle modified fumed silica decorated graphene nanoribbon nanocomposite. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 250, p. 85 – 90, 2017.

PECKOVÁ, K.; MUSILOVÁ, J.; BAREK, J. Boron-Doped Diamond Film Electrodes- New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 148-172, 2009.

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

RACZ, L.A.; GOEL, R.K. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. **Journal of Environmental Monitoring** v.12, p. 58 – 70, 2010.

RADHAKRISHNAN, S.; KRISHNAMOORTHY, K.; SEKAR, C.; WILSON, J.; KIM, S.J. A highly sensitive electrochemical sensor for nitrite detection based on Fe₂O₃ nanoparticles decorated reduced graphene oxide nanosheets. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 148–149, p. 22–28, 2014.

RIBEIRO, W.F. **Análise de Traços do Pesticida Carbendazim por Voltametria de Onda Quadrada com Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubos de Carbono**. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciência Exatas e da Natureza – Departamento de Química, Universidade Federal de Paraíba - João Pessoa – PB - Brasil 2009.

RODGERS-GRAY, T.P.; JOBLING, S.; MORRIS, S.; KELLY, C.; KIRBY, S.; JANBAKSH, A.; HARRIES, J.E.; WALDOCK, M.J.; SUMPTER, J.P.; TYLER, C.R. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. **Environmental Science & Technology**, v.34(8) p. 1521 – 1528, 2000.

SIEGENTHALER, P.F.; BAIN, P.; RIVA, F.; FENT, K. Effects of antiandrogenic progestins, chlormadinone and cyproteroneacetate, and the estrogen 17 β -ethinylestradiol (EE2), and their mixtures: Transactivation with human and rainbowfish hormonereceptors and transcriptional effects in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 142–162, 2017.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Applications of high performance liquid chromatography for the study of emerging organic pollutants. **Química Nova**, v. 34, n.4, p. 665 – 676, 2011.

SILVA, C.P.; LIMA, D.L.D.; SCHNEIDER, R.J.; OTERO, M.; ESTEVES, V.I. Development of ELISA methodologies for the direct determination of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in complex aqueous matrices. **Journal of Environmental Management**, v. 124, p. 121–127, 2013.

SILVA, C.P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Process for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 38-58, 2012.

SINGH, B.P.; KUMAR, A.; DUARTE, P.A.; ROJAS, S.J.; MEDINA, M.C.; MARTINEZ, H.I.A.; OLIVENCIA, C.A.V.; TOMAR, M.S. Synthesis, characterization, and electrochemical response of iron oxide nanoparticles for sensing acetaminophen. **Materials Research Express**, v. 3.10: 106105, 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

SMAJADOR, J.; PIECH, R.; PIEK, M.; PACZOSA-BATOR, B. Sensitive voltammetric determination of ethinyl estradiol on carbon black modified electrode. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 164, n. 13, p. H885-H889, 2017.

SMAJADOR, J.; PIECH, R., LAWRYWIANIEC, M.; PACZOSA-BATOR, B. Glassy carbon electrode modified with carbon black for sensitive estradiol determination by means of voltammetry and flow injection analysis with amperometric detection. **Analytical Biochemistry**, v. 544, p. 7 – 12, 2018.

SONG, X.; WEN, Y. WANG, Y.; ADEEL, M.; YANG, Y. Environmental Risk Assessment of the Emerging EDCs Contaminants from Rural Soil and Aqueous Sources: Analytical and Modelling Approaches. **Chemosphere**, v. 198, p. 546 – 555, 2018.

SOUZA, L.P. **Híbridos de Nanotubos de Carbono e Hematita: Síntese e Caracterização**. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Exatas Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2011.

SPRITZE, P. M. Relevância da Avaliação dos Sintomas e Dosagem de Estradiol no Tratamento de Reposição Hormonal em Pacientes Pós-Menopáusicas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 43 no.5, p. 310- 312, 1999.

SUN, X.D.; WU, H.L.; LIU, Z.; XIE, L.X.; HU, Y.; FANG, H.; WANG, T.; XIAO, R.; DING, Y.J.; YU, R.Q. Chemometrics-Assisted Liquid Chromatography-Full Scan Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Multi-Class Estrogens in Infant Milk Powder. **Analytical Methods**, v. 10, p. 1459 – 1471, 2018.

SURESH, R.; VIJAYARAJ, A.; GIRIBABU, K.; MANIGANDAN, R.; PRABU, R.; STEPHEN.; THIRUMAL, E.; NARAYANAN. Fabrication of Iron Oxide Nanoparticles: Magnetic and Electrochemical Sensing Property. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 24, p, 1256-1263, 2013.

TAO, I.; LI, Y.; ZHAO, P.; LI, J.; DUA, Y.; ZHAO, W.; YANG, R. Development of Spiropyran Based Electrochemical Sensor via Simultaneous Photochemical and Target-Activatable Electron Transfer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 151-157, 2014.

TERUI, N.; FUGESTSU, B.; TANAKA, S. Voltammetric Behavior and Determination of 17 β -Estradiol at Multi-Wall Carbon Nanotube-Nafion Modified Glassy Carbon Electrode. **Analytical Sciences**, v. 22, p. 895 – 898, 2006.

TSENG, T.T-C.; GUSVIPUTRI, A., HOA, L.N.Q. A simple, sensitive and compact electrochemical ELISA for estradiol based on chitosan deposited platinum wire microelectrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 758, p. 59 – 67, 2015.

USLU, B.; OZKAN, S. A.; Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. **Analytical Letters**, v. 44, n. 16, p. 2644-2702, 2011.

VAJDA, A. M.; BARBER, L. B.; GRAY, J. L.; LOPES, E.M.; BOLDEN, A.M.; SCHENFUSS, H.L.; NORRIS, D.O. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. **Aquatic toxicology**, v. 103, n. 3-4, p. 213–221, 2011.

VEGA, D.; AGUÍ, K., GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M. Electrochemical detection of phenolic estrogenic compounds at carbon nanotube-modified electrodes. **Talanta**, v. 71, p. 1031-1038, 2007.

WANG, J. (Ed). Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications; Deerfield beach: VCH Publishers, 1985.

WANG, L.H.; JSENG, S. F. Amperometric Detection of Estradiol and its Metabolites in Menstrual Women and the Urine of Pregnant Rabbits. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28: p. 1367–1381, 2005.

WILDGOOSE, G.G.; BANKS, C.E.; LEVENTIS, H.C. & COMPTON, R.G. Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis. **Microchim. Acta**, v. 152(3-4), p. 187-214, 2006.

YILMAZ, B.; KADIOGLU, Y. Determination of 17 b-estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, p. 1422-1428, 2017.

YING, G.G.; KOOKANA, R.S.; RU, Y.J. Occurrence and fate of hormone steroids. in the environment. **Environment International** v. 28, p. 545 - 551 2002.

YING, L.; ZHAO, X.; LI, P.; et.al. Highly sensitive Fe₃O₄nanobeads/graphene-based molecularly imprinted electrochemical sensor for 17β-estradiol in water. **Analytical Chimica Acta**, v.884, p.106 - 113, 2015.

ZAPOROTSKOVA, V.I.; BOROZNINA, P.; PARKHOMENKO, N.Y.; KOZHITOV, L.V. Carbon Nanotubes: Sensor properties: A review. **Modern Electronic Materials**, v. 2 (4), p.95-105, 2016.

ZHANG, X.; PENG, Y.; BAI, J.; NING, B.; SUN, S.; HONG, X.; LIU, Y.; LIU, Y.; GAO, Z. A novel electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted

polymer and gold nanomaterials amplification for estradiol detection. **Sensor and Actuators B-Chemical**, v. 200, p. 69 – 75, 2014.