

**APLICAÇÃO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO E MODIFICADO  
COM UM SOLVENTE EUTÉTICO PARA DETECÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL E  
PROGESTERONA**

**Camila Garcia Neves**

**APLICAÇÃO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO E MODIFICADO  
COM UM SOLVENTE EUTÉTICO PARA DETECÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL E  
PROGESTERONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD para obtenção do título de Mestre em Química.  
Orientador: Prof. Dr. Willyam R. P. Barros.

**Camila Garcia Neves**

Dourados/MS  
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N513a Neves, Camila Garcia

APLICAÇÃO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO E MODIFICADO COM UM SOLVENTE EUTÉTICO PARA DETECÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL E PROGESTERONA [recurso eletrônico] / Camila Garcia Neves. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Willyam Róger Padilha Barros.

Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Eletrodo impresso à base de papel. 2. BTEAC+AM. 3. Carbone Printex 6L. 4. 17 $\beta$ -estradiol. 5. Progesterona.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA / FACET

**Termo de Aprovação**

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Aplicação de um sensor eletroquímico impresso e modificado com um solvente eutético para detecção de 17 $\beta$ -estradiol e Progesterona”**, de autoria de **Camila Garcia Neves**, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

  
Prof. Dr. Willyam Róger Padilha Barros  
SIAPE 1253134  
UFGD

---

Prof. Dr. Willyam Róger Padilha Barros (Orientador-UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora



---

Profa. Dra. Adriana Evaristo de Carvalho  
Membro Examinador (UFGD)



---

Prof. Dr. Fábio Ruiz Simões Membro  
Examinador (UNIFESP)

Dourados/MS, 16 de julho de 2021

## Resumo

Os sensores eletroquímicos vêm sendo utilizados para controle das dosagens de contaminantes emergentes, principalmente de compostos endócrinos, dentre estes o 17 $\beta$ -estradiol (E2) e Progesterona (P4). Desta forma, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um eletrodo impresso de papel (EIP) a base de grafite e dopado com uma mistura de carbono Printex 6L (EIP-CP6L) e solvente eutético (SE) (EIP-CP6L<sub>SE</sub>), usado para determinação e quantificação de E2 e P4 em amostras de água mineral, urina sintética e saliva artificial. A caracterização física dos eletrodos foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Óptica (MO). A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada aplicando as técnicas de Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE). As medidas eletroquímicas foram realizadas em um sistema composto por uma célula de compartimento único (100 mL), contendo um eletrodo de referência (Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub>), fio de Pt como contra eletrodo e EIP como eletrodo de trabalho. Estudos da variação das camadas de tinta de grafite, variação da proporção da tinta de grafite, bem como a repetibilidade e reprodutibilidade cíclica dos eletrodos foram realizados por VC em eletrólito suporte de cloreto de potássio (KCl) 0,5 mol L<sup>-1</sup> com par redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 mmol L<sup>-1</sup>. A partir destes estudos, averiguou-se que a aderência de 2 camadas de tinta de grafite na proporção da tinta composta por grafite:verniz 50%/50% (m/v) tiveram melhores respostas eletroquímicas a partir dos valores calculados pelos critérios de reversibilidade, corroborando com os resultados de reprodutibilidade e repetibilidade dos eletrodos. Também foi avaliada a estabilidade eletroquímica do EIP pela técnica de cronoamperometria, em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo 1 mmol L<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, o qual apresentou oscilações de ~2,0% durante o período de 8h. Posteriormente, a eletroatividade de E2 e P4 foram avaliadas por meio da voltametria de pulso diferencial (VPD) em tampão fosfato (PBS) 0,1 mol L<sup>-1</sup> nos pH 7,0 e 4,0, respectivamente. Com estes estudos, observou-se sinais oxidativos de E2 e P4 próximos a +0,98 V e +0,54 V, respectivamente. As faixas lineares de concentrações estudadas de E2 foram 0,00732 – 0,417  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (LD= 0,177  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) para EIP não dopado e 0,00090 – 0,21  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (LD= 0,0065  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) para o EIP-CP6L<sub>SE</sub>. Para o estudo de detecção da P4 as faixas lineares das concentrações foram de 0,0090 – 0,812  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (LD= 0,00582  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) e 0,00080 – 0,050  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (LD= 0,00075  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) para o EIP não dopado e EIP-CP6L<sub>SE</sub>, respectivamente. O uso do SE + carbono Printex 6L como dopante do EIP, permitiu fortes interações intramoleculares com as moléculas dos analitos, aumentando a intensidade das respostas de corrente, tornando o sensor com maior sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade. Os estudos de recuperação de E2 e P4 foram realizados no EIP-CP6L<sub>SE</sub> em amostras de água mineral, urina sintética e saliva artificial, obtendo-se recuperações entre 92,15% - 110,01%. Pelo estudo de validação do método (espectroscopia UV-Vis), as concentrações de E2 e P4 estudadas (10 e 60  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) demonstraram resultados de recuperação entre + 99,16% (+ 1,4%) e + 100,16% (+ 1,9%).

Palavras-chave: eletrodo impresso à base de papel, BTEAC+AM, carbono Printex 6L, 17 $\beta$ -estradiol, progesterona.

## Abstract

Electrochemical sensors have been used to control the dosage of emerging contaminants, mainly in endocrine compounds, including 17 $\beta$ -estradiol (E2) and Progesterone (P4). Thus, the present work proposes the development of a graphite-based screen-printed paper electrode (SPE) doped with a mixture of Printex 6L carbon (SPE-P6LC) and deep eutectic solvent (DES) (SPE-P6LC<sub>DES</sub>), used for detection and quantification of E2 and P4 in mineral water, synthetic urine and artificial saliva samples. The physical characterization of the electrodes was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Optical Microscopy (OM). The electrochemical characterization of the electrodes was performed using the techniques of Cyclic Voltammetry (VC) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIE). The electrochemical measurements were performed in a system composed of a single compartment cell (100 mL), containing a reference electrode (Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub>), Pt wire as counter electrode and SPE as working electrode. Studies of the variation of graphite ink layers, variation of the proportion of graphite ink, as well as the cyclic repeatability and reproducibility of the electrodes were carried out by VC in 0.5 mol L<sup>-1</sup> potassium chloride (KCl) support electrolyte containing 1 mmol L<sup>-1</sup> of redox pair Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>. From these studies, it can be verified that the adherence of 2 layers of graphite ink in the proportion the graphite:varnish 50%/50% (w/v) had better electrochemical responses from the values calculated by the reversibility criteria, corroborating the results of reproducibility and repeatability of the electrodes. The electrochemical stability of SPE was also evaluated by the chronoamperometry technique in 0.5 mol L<sup>-1</sup> KCl containing 1 mmol L<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, which presented oscillations of ~2.0% during the 8 hours period. Subsequently, the electroactivity of E2 and P4 were evaluated by differential pulse voltammetry (DPV) in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.0 and 4.0, respectively. With these studies, oxidative signals of E2 and P4 were observed close to +0.98V and 0.54 V, respectively. The linear ranges of E2 concentrations studied were 0.00732 – 0.417  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (LD= 0.177  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) for non-doped SPE and 0.00090 – 0.21  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (LD= 0.0065  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) for the SPE-P6LC<sub>DES</sub>. For the P4 detection study, the linear concentrations ranges were 0.0090 – 0.812  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (LD= 0.00582  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) and 0.00080 – 0.050  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (LD= 0.00075  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) for the non-doped SPE and SPE-P6LC<sub>DES</sub>, respectively. The use of DES + Printex 6L carbon as a dopant of the SPE, allowed strong interactions intramolecular with the analyte molecules, increasing the intensity of the current responses, being a sensor with greater sensitivity, selectivity and reproducibility. E2 and P4 recovery studies were performed in the SPE-P6LC<sub>DES</sub> in mineral water, synthetic urine and artificial saliva samples, obtaining recoveries between 92.15% - 110.01%. By method validation study (UV-Vis Spectroscopy), the E2 and P4 concentrations studies (10 and 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) demonstrated recovery results between +99.16% (+1.4%) and +100.16% (+1.9%).

Keywords: paper screen-printed electrode, BTEAC+MA, Printex 6L carbon, 17 $\beta$ -estradiol, progesterone.

Dedico este trabalho aos meus pais, Diva e Samuel, que são meu porto seguro, dando-me apoio em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus e Nossa Senhora de Fátima, pelas bênçãos concebidas todos os dias da minha vida, em especial neste período de mestrado.

Gratidão ao professor e orientador Dr. Willyam Róger Padilha Barros, que desde o princípio perseverou pela orientação, depositando toda sua confiabilidade e credibilidade neste trabalho. Agradeço pelo exemplo de profissional e ser humano que és, levando todas as lições que foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

Gratidão aos professores Dra. Patrícia Suegama e Dr. Ivan Ramires, por compartilhar o espaço do laboratório conosco, e pelas conversas e aprendizagens em tempos vagos.

Gratidão aos professores Victor Hugo, Evaristo, Heberth, Cândida e Guilherme Paveglio pela disponibilidade (junto a seus alunos) no auxílio das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia de Infravermelho, Espectroscopia de UV-Vis, Microscopia Óptica e colaboração para síntese do solvente eutético, respectivamente.

Agradeço meus familiares, especialmente meus pais e minha irmã, que sempre estiveram me apoiando e incentivando para lutar diante das adversidades, que eu mesma descreditei por muitas vezes que poderia vencê-las. Obrigada por serem bênçãos em minha vida.

Agradeço aos colegas do Grupo de Eletrocatalise e Tecnologia Eletroquímica – GETE e aos colegas de laboratório, que compartilharam suas vivências e que se tornaram amigos importantes na minha vida.

Agradeço à Banca por aceitar o convite.

Agradeço aos funcionários terceirizados, pela disposição de organizar o espaço do laboratório, tornando nosso lar.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida, à UFGD pela minha formação.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Ascórbico

AM – Ácido Malônico

BTEAC – Cloreto de benziltriethylamônio

CAF – Cafeína

DPR – Desvio padrão relativo

E2 – 17 $\beta$ -estradiol

EE2 – 17 $\alpha$ -etinilestradiol

EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica

EIP – Eletrodo impresso de papel.

EIP-CP6L – Eletrodo impresso de papel modificado com carbono Printex 6L

EIP-CP6L<sub>SE</sub> – Eletrodo impresso de papel modificado com carbono Printex 6L dopado com solvente eutético

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LOS – Losartana Potássica

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Óptica

P4 – Progesterona

PBS – Tampão fosfato

SE – Solvente eutético

VC – Voltametria Cíclica

VL – Voltametria Linear

VOQ – Voltametria de onda quadrada

VPD – Voltametria de pulso diferencial

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações de eletrodos impressos em amostras biológicas, farmacêuticas e ambientais.....	24
Tabela 2. Otimização dos parâmetros da Voltametria de Pulso Diferencial para detecção de E2 e P4.....	29
Tabela 3. Estudo dos critérios de reversibilidade para o EIP (1 a 4 camadas de tinta de grafite), EIP-CP6L (2 camadas de tinta de grafite) e EIP-CP6L <sub>SE</sub> (2 camadas de tinta de grafite) em KCl 0,5 mol L <sup>-1</sup> .....	35
Tabela 4. Valores dos elementos de circuito equivalente obtidos por EIE. ....	39
Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos pelas determinações individuais de E2 e P4 em EIP e EIP-CP6L <sub>SE</sub> .....	50
Tabela 6. Parâmetros obtidos da curva analítica das análises de E2 e P4 e comparação com estudos previamente publicados. ....	51
Tabela 7. Detecção e recuperação do E2 e P4 em amostras reais utilizando o EIP-CP6L <sub>SE</sub> . ...	52
Tabela 8. Estudo do efeito dos interferentes na determinação de E2 e P4 frente a EIP-CP6L <sub>SE</sub> . ....	54
Tabela 9. Determinação do E2 e P4 em amostra de água mineral frente ao EIP-CP6L <sub>SE</sub> . ....	55

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fórmulas estruturais dos hormônios (A)  $17\beta$ -estradiol e (B) Progesterona..... 18
- Figura 2. Etapas de construção dos eletrodos impressos de papel: (A) substrato de papel, (B) adesão da tinta de grafite sobre o substrato e compactação com a espátula, (C) delimitação da área geométrica e do tamanho do EIP e (D) recobrimento do EIP com adesivo impermeável.. .....27
- Figura 3. Representação esquemática da célula eletroquímica composta pelo (A) eletrodo de referência Ag/AgCl/KClsat., (B) eletrodo auxiliar fio de platina e (C) eletrodo de trabalho EIP. ....29
- Figura 4. Imagens obtidas por MEV dos diferentes eletrodos impressos de carbono: (A) EIP-2G (50mG/50vV), (B) EIP-CP6L e (C) EIP-CP6L<sub>SE</sub>. ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5. Espectros de infravermelho obtidos para as amostras de (A) grafite em pó, (B) grafite em pó com verniz vitral, (C) carbono Printex 6L e (D) carbono Printex 6L dopado com SE. .... 32
- Figura 6. Voltamogramas cíclicos com as velocidades de varredura de 1 a 500  $\text{mV s}^{-1}$  para estudo de camadas de tinta de grafite no EIP, variando em (A) 1 camada de tinta de grafite, (B) 2 camadas de tinta de grafite, (C) 3 camadas de tinta de grafite e (D) 4 camadas de tinta de grafite e o (E) comparação dos eletrodos sem e com a modificação do EIP-2G (50mG/50vV) com carbono Printex 6L + SE. As medidas foram realizadas em KCl 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  contendo solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  1  $\text{mmol L}^{-1}$ . ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7. (A) Voltamogramas cíclicos a 50  $\text{mV s}^{-1}$  do estudo comparativo das proporções de tinta de grafite no EIP: (I) 40m de grafite/60v de verniz, (II) 50m de grafite/50v de verniz, (III) 60m de grafite/40v de verniz, (B) correlações lineares dos picos anódicos e catódicos para o EIP em 50m de grafite/50v de verniz e 60m de grafite /40v de verniz. ....38
- Figura 8. Espectro de impedância eletroquímica em solução para os diferentes eletrodos: EIP-2G (50mG/50vV), EIP-2G (60mG/40vV) e EIP-CP6LP6L<sub>SE</sub>. As medidas foram realizadas em KCl 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  contendo solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  1  $\text{mmol L}^{-1}$ . .... 36
- Figura 9. Estudo da estabilidade do EIP-2G (50mG/50vV) por cronoamperometria em KCl 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  contendo 1  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . Potencial aplicado de +0,3V. ....38
- Figura 10. Voltamogramas cíclicos para estudo de repetibilidade no EIP 50mG/50vV em KCl 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  (linha preta) contendo 1  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (linha vermelha). Total de 100 ciclos. ....40

Figura 11. Voltamogramas cíclicos para estudo de reprodutibilidade (A) no mesmo dia (intraday) com diferentes eletrodos de mesma configuração e (B) em 35 dias consecutivos (interday) com único eletrodo para o EIP-2G (50mG/50vV) em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo 1 mmol L<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>..... 39

Figura 12. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo da influência do pH para detecção de E2 (7,32 μmol L<sup>-1</sup>) em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> usando EIP-2G (50mG/50vV). Inset: mecanismo eletroquímico de oxidação do E2. (B) ΔI<sub>p</sub> vs. pH e ΔE<sub>p</sub> vs. pH. .... 40

Figura 13. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo da influência do pH para detecção de P4 (79,4 μmol L<sup>-1</sup>) em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> usando EIP-2G (50mG/50vV). Inset: mecanismo eletroquímico de oxidação da P4. (B) ΔI<sub>p</sub> vs. pH e ΔE<sub>p</sub> vs. pH..... 41

Figura 14. (A) Voltamogramas cíclicos da detecção de 0,13 mmol L<sup>-1</sup> E2 em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) com velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> – 100 mV s<sup>-1</sup>, (B) *i* vs. *v* e (C) log *i* vs. log *v*..... 45

Figura 15. (A) Voltamogramas cíclicos da detecção de 0,16 mmol L<sup>-1</sup> P4 em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) com velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> – 100 mV s<sup>-1</sup>, (B) *i* vs. *v* e (C) log *i* vs. log *v*. .... 44

Figura 16. Voltamogramas de pulso diferencial aplicados no EIP para a detecção de (A-I) E2 com variação de concentração entre 0,00732 a 0,417 μmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e (B-I) P4 com variação de concentração entre 0,009 a 0,812 μmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0). Correlação linear de *i*<sub>pa</sub> vs. concentração para obtenção da curva analítica da detecção de (A-II) E2 e (B-II) P4..... 45

Figura 17. Voltamogramas de pulso diferencial aplicados no EIP-CP6L<sub>SE</sub> para a detecção de (A-I) E2 com variação de concentração entre 0,0009 a 0,21 μmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e (B-I) P4 com variação de concentração entre 0,0008 a 0,05 μmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0). Correlação linear de *i*<sub>pa</sub> vs. concentração para obtenção da curva analítica da detecção de (A-II) E2 e (B-II) P4..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 18. Voltamogramas de pulso diferencial em EIP-CP6L<sub>SE</sub> obtidos durante o estudo de repetibilidade (A) intra-day e reprodutibilidade (B) inter-day para determinação de 0,09 μmol L<sup>-1</sup> E2. .... 51

Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial em EIP-CP6L<sub>SE</sub> obtidos durante estudo de repetibilidade (A) intra-day e reprodutibilidade (B) inter-day para determinação de 0,009 μmol L<sup>-1</sup> P4..... 51

Figura 20. Mecanismo proposto para detecção do E2 pela interação entre CBTEA:AM (1:2, razão molar) e analito. (A) Modo bidimensional e (B) tridimensional. ....54

Figura 21. Mecanismo proposto para detecção do P4 pela interação entre CBTEA:AM (1:2, razão molar) e analito. (A) Modo bidimensional e (B) tridimensional. ....56

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Contaminantes emergentes .....	18
2.2 Técnicas eletroanalíticas para detecção de contaminantes emergentes .....	19
2.2.1 Sensores eletroquímicos .....	19
3 OBJETIVOS .....	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos .....	25
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	26
4.1 Reagentes e soluções .....	26
4.2 Preparação dos eletrodos impressos de papel .....	26
4.3 Caracterização dos eletrodos impressos de papel .....	28
4.4 Sistema eletroquímico e detecção de E2 e P4.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1 Caracterização morfológica e estrutural dos eletrodos impressos de papel.....	31
5.2 Caracterização eletroquímica dos eletrodos impressos de papel .....	34
5.2.1 Estudo do número de camadas de tinta de grafite e modificação do EIP .....	34
5.2.2 Estudo da variação da proporção de tinta de grafite .....	37
5.3 Aplicação do EIP para o estudo do comportamento eletroquímico do E2 e P4 .....	42
5.3.1 Estudo da influência do pH .....	42
5.4 Aplicação do EIP e EIP-CP6L <sub>SE</sub> para a detecção e quantificação de E2 e P4.....	47
5.5 Estudo de recuperação, seletividade e validação do método .....	51
5.6 Proposta de mecanismo de oxidação do E2 e P4.....	56
6 CONCLUSÕES .....	60
7 REFERÊNCIAS .....	61
APÊNDICE .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

No decorrer dos anos, a produção industrial de novos produtos vem aumentando significativamente e isto provoca níveis elevados de descarte destes insumos no solo, na água e no ar, através dos efluentes domésticos, industriais e hospitalares. Logo, define-se como contaminantes emergentes, quando estes produtos apresentam riscos potenciais à saúde humana e às espécies que vivem no ecossistema que são dejetados (DIAMANTIKANDARAKIS et al., 2009; ROUT et al., 2021). Dessa forma, desreguladores endócrinos constituem um grupo de contaminantes emergentes que interferem diretamente nas funções endócrinas do ser humano e de outras espécies, alterando os níveis de receptor hormonal e do metabolismo. Esses compostos podem causar a contaminação de lençóis freáticos, rios, solos ou mesmo mananciais de abastecimento público. O acúmulo de compostos na biota aquática ocorre ao longo da cadeia trófica, sendo um alto risco à saúde humana (SIFAKIS et al., 2017; YOU; SONG, 2021).

Os desreguladores endócrinos abrangem uma ampla variedade de grupos químicos, dentre estes, destacam-se os hormônios de origem natural e sintética (JONES-LEPP; STEVENS, 2007; YING; KOOKANA; RU, 2002), responsáveis por desenvolver as características femininas no início da puberdade, atuando no controle da ovulação, no desenvolvimento e preparação do aparelho reprodutor para a fecundação e implantação do óvulo, e alargamento das glândulas mamárias durante a gravidez (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015; RODRIGUEZ-NARVAEZ et al., 2017).

Devido ao alto impacto no meio ambiente e na saúde humana, diversos estrogênios e progestágenos como 17 $\beta$ -estradiol (E2) e Progesterona (P4), respectivamente, além de seus metabólitos, têm sido aplicados em contraceptivos orais, sendo então excretados de forma livre em urina ou fezes, ou mesmo detectados na saliva e no sangue, devido altos índices destes no início da puberdade, sendo essenciais para regulação dos ciclos femininos. A excreção dos hormônios pelos seres humanos é um dos principais contribuintes para a presença de contaminantes emergentes no meio ambiente (BALZER et al., 2015; GRANDI; NAPOLITANO; CAGNACCI, 2016; JONES-LEPP; STEVENS, 2007; YING; KOOKANA; RU, 2002).

A maioria dos hormônios produzidos são liberados em estações de tratamento de águas residuais, onde a remoção é dificultada devido às propriedades e parâmetros físico-

químicos, o tipo de processo de tratamento/disposição e atividade microbiana (BARREIROS et al., 2016). De fato, os processos convencionais de tratamento de águas residuais não são capazes de removê-los completamente, o que potencializa o efeito desses produtos químicos no ambiente aquático (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010; SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012; XU et al., 2012).

Recentemente, a presença de hormônios no meio ambiente vem atraindo muita atenção, devido à sua adversidade dos efeitos nos organismos vivos, mesmo em concentrações de  $ng L^{-1}$  e  $pg L^{-1}$  (COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010; HAO et al., 2011; SUN; DENG; LONG, 2018). Perante os riscos que os hormônios representam para os seres humanos e fauna, há a necessidade de controle destes recorrendo então ao desenvolvimento de novas tecnologias de detecção. Sendo assim, os métodos eletroquímicos, se destacam como promissores, possuindo vantagens como rapidez de análises, fácil preparação de amostras, miniaturização e automatização do sistema de análises. Em termos de respostas de corrente dos analitos, apresentam baixa queda ôhmica no sistema e melhoras no processo cinético, além de elevada sensibilidade analítica e seletividade (COMPTON, 2018; JANEGITZ et al., 2014; KUPCOVÁ; REIFFOVÁ, 2017).

Nesse sentido, novas formas de construção de sensores eletroquímicos permitem diferentes tecnologias no desenvolvimento de dispositivos mais sensíveis e com alta detectabilidade de várias espécies. Logo, o eletrodo impresso se torna vantajoso, oferecendo boas propriedades eletroquímicas, baixa resistência de material e obtenção de limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) baixos, sendo possível utilizar diferentes substratos para a impressão destes, que incluem diversos tipos de papeis, plásticos e cerâmicas (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016; LI et al., 2012; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

É importante enfatizar que a modificação da superfície de eletrodos é um fator importante para obtenção de maiores respostas eletroquímicas, bem como baixos valores de LOD e LOQ. O uso de modificadores, como alótropos de carbono (grafeno, carbono Printex 6L e nanotubos de carbono) são extensivamente estudados na literatura (DEROCO et al., 2019; MORAES et al., 2015; REZAEI et al., 2018; SHUMYANTSEVA et al., 2016) com o objetivo de tornar mais sensível a detecção eletroquímica de uma série de analitos em diferentes tipos de amostras. Ademais, para aumentar a detecção e sensibilidade analítica, busca-se novas formas de modificação desses materiais carbonáceos com bases de Schiff (REVENGA-PARRA et al., 2020), compostos de coordenação (WONG et al., 2019),

compostos bioativos/enzimas (CORDEIRO et al., 2019), líquidos iônicos e solventes eutéticos (SE) (BRETT, 2018).

Nesse sentido, os processos de modificação de eletrodos, busca-se por métodos rápidos e de baixo custo. No entanto, alguns modificadores como os compostos de coordenação e líquidos iônicos apresentam algumas desvantagens em relação ao tempo de síntese/baixo rendimento e elevado custo, respectivamente. Dessa forma, os SE são uma alternativa viável, pois apresentam baixo custo em relação aos líquidos iônicos, inexistência de uso de solventes ou qualquer tipo de purificação para a sua obtenção, são biodegradáveis, não apresentam toxicidade, além de apresentar 100% de “economia atômica” (NKUKU; LESUER, 2007). Assim, a aplicação dos SE como modificadores de eletrodos é promissora, uma vez que por meio das ligações de hidrogênio presentes nas suas estruturas, ocorre maior interação com o analito.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

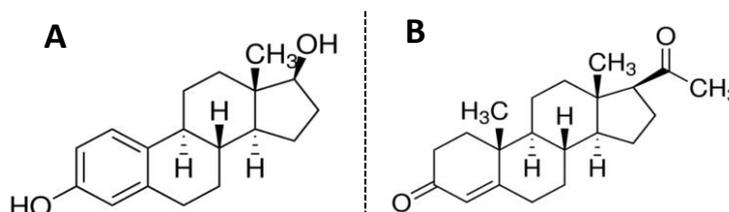
### 2.1 Contaminantes emergentes

Nas últimas décadas, tem-se aumentado os estudos sobre as características das águas residuais, com atenção para ocorrência de uma infinidade de compostos químicos orgânicos que ficaram conhecidos como contaminantes emergentes (RATHI; KUMAR; SHOW, 2021; RICHARDSON; KIMURA, 2020; YANG et al., 2019). A literatura relata algumas definições para os contaminantes emergentes e, dentre elas, Pablos, García-Hortigüela e Fernández (2015) abordam que “os contaminantes emergentes definem uma variedade de compostos químicos que são usados e liberados no meio ambiente, mas que tem potencial para causar efeitos adversos sobre a saúde humana, sendo estes efeitos conhecidos ou suspeitos” (PABLOS; GARCÍA-HORTIGÜELA; FERNÁNDEZ, 2015).

Os contaminantes emergentes são classificados em diversas categorias, as quais destacam-se os produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, surfactantes, retardadores de chama, cosméticos, hormônios e compostos de desregulação endócrina (BUNKE et al., 2019). Em águas residuais e estações de tratamento de esgoto, alguns fatores afetam a eficiência de remoção dos contaminantes emergentes, tais como as propriedades físico-químicas dos compostos (pKa, Kow), as condições operacionais de tratamento (tempo de retenção do lodo, tempo de retenção hidráulica, condições redox) e as características da água residual (força iônica, concentração de matéria orgânica, pH) (BITTENCOURT et al., 2016; DE AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

Quanto a variedade de contaminantes emergentes encontradas em águas superficiais, chamam-se atenção para os estrogênios e progestágenos, que podem ser classificados como hormônios naturais ou sintéticos. Estrogênios naturais (conhecidos como grupo C18) compartilham a mesma estrutura molecular tetracíclica compreendendo quatro anéis contendo um grupo fenólico, dois ciclohexanos e um anel de ciclo-pentano. Nesta classe, destaca-se o E2 (Figura 1A). Por sua vez, progestágenos como a P4 (Figura 1B), são hormônios importantes para a função reprodutiva, sendo assim classificados por possuir estruturas C21 (MARTÍN-POZO et al., 2019; PENA-PEREIRA et al., 2021; TARABORRELLI, 2015).

Figura 1. Fórmulas estruturais dos hormônios (A) 17 $\beta$ -estradiol e (B) Progesterona.



Diante do aumento de ocorrências de estrogênios e progestágenos no meio ambiente, voltou-se o “olhar” de preocupação para detecção e remoção desses compostos, que por sua vez, numa escala global, estima-se que a população humana descarta cerca de 30.000 Kg/ano de estrogênios de origens naturais (E2 e P4) e cerca de 700 Kg/ano de estrogênios sintéticos como 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), muito consumido em pílulas anticoncepcionais (LANGE et al., 2002; LECOMTE et al., 2017).

No entanto, esteroides também são usados na pecuária, afim de melhorar as taxas de crescimento do gado, bem como a eficiência alimentar e obtenção de massa muscular magra. Com esse uso, estima-se que a liberação dos estrógenos pelo meio da pecuária é aproximadamente 83.000 Kg/ano, um pouco a mais que o dobro da taxa de descarga humana. Claramente, estrogênios naturais e sintéticos em resíduos animais e humanos representam um sério risco para o ambiente, não existindo regulamentos mais firmes que controlem estes compostos, o que gera um aumento das pesquisas científicas que introduzem tecnologias analíticas para detecção e quantificação dos mesmos (ADEEL et al., 2018; BISWAS et al., 2013; SHRESTHA et al., 2012).

## **2.2 Técnicas eletroanalíticas para detecção de contaminantes emergentes**

### **2.2.1 Sensores eletroquímicos**

A maioria dos métodos analíticos atuais depende em grande parte de técnicas analíticas baseadas em processos que muitas vezes requerem equipamentos caros e, que podem ser submetidos a testes dispendiosos e envolvem longos processos de detecção. Nesse sentido, mais atenção é dada aos dispositivos analíticos miniaturizados, e que durante décadas vêm sendo desenvolvidos e utilizados em diversas aplicações analíticas, tais como áreas clínicas, industriais, químicas e biológicas (BAIG; SAJID; SALEH, 2019).

Estes dispositivos, também chamados de sensores eletroquímicos podem ser definidos como “línguas eletrônicas” (*do inglês electronic tongue*) que fornecem respostas imediatas para um determinado tipo de composto químico (dependente da concentração das espécies químicas) por meio de um transdutor, que transforma essas respostas em sinais na instrumentação química, sendo então classificados de acordo com suas propriedades ópticas e elétricas. Um dos grandes desafios que estão sendo enfrentados pelos pesquisadores é o desenvolvimento de sensores que permitem determinar espécies químicas com alta

reprodutibilidade, baixos custos, boa seletividade, boa transferência de cargas entre o bulk e a superfície do sensor, bem como uma superfície estável. Destacam-se três tipos de sensores eletroquímicos: potenciométricos, condutométricos e amperométricos (KIMMEL et al., 2012).

Sensores potenciométricos são aqueles capazes de medir determinados tipos de espécies iônicas, com medições de potenciais na superfície do eletrodo, geralmente composto por uma membrana. Há algum tempo as pesquisas voltadas para esses sensores buscavam ressaltar a importância da composição dessa membrana, mas atualmente vêm sendo destacadas pesquisas voltadas à seletividade das espécies-alvo, sendo muito aplicados para medições de pH, por exemplo (KIMMEL et al., 2012; OZKAN; KAUFFMANN; ZUMAN, 2015). Entretanto, estes tipos de sensores já são dependentes das mudanças de condutividade de um filme ou superfície do eletrodo, na qual a condutividade é influenciada a partir dos analitos presentes no meio da solução. Geralmente, os métodos condutométricos não são muitos seletivos, mas se tornam viáveis nos casos de determinação rápida de analitos que necessitam da medição da condutividade da solução (OZKAN; KAUFFMANN; ZUMAN, 2015; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

Recentemente, o principal objetivo dos pesquisadores é o desenvolvimento de sensores amperométricos, em que ocorre processos de medição de corrente por meio de um potencial aplicado. Na maioria dos casos, o uso destes sensores aplica-se às técnicas voltamétricas, onde controla-se o potencial de célula além de apresentar a facilidade na transferência de elétrons do analito de interesse. Dentre a classe de sensores amperométricos, destacam-se os eletrodos baseados em materiais de carbono (grafite, carbono vítreo, pasta de carbono, microeletrodos de fibras de carbono, nanotubos de carbono e diamante dopado com boro - DDB), eletrodos de metais, eletrodos impressos e eletrodos modificados. Estes apresentam baixos custos, fácil operação, inércia química e versatilidade em suas janelas de potenciais (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2011; POWER; MORRIN, 2013).

Eletrodos à base de materiais de carbono são muito utilizados em estudos voltamétricos, pois são materiais de custo relativamente baixo, possuem estabilidade superficial e alguns deles podem ser facilmente modificados devido à superfície e/ou morfologia do carbono. Dentre todos os eletrodos de carbono, faz-se destaque ao DDB, eletrodo de carbono vítreo (ECV) e eletrodo de pasta de carbono (EPC). As aplicações destes eletrodos apresentam algumas vantagens como avaliar espécies orgânicas pela oxidação e

redução, possibilitando o estudo dos analitos em regiões com potenciais mais positivos (POWER; MORRIN, 2013; DEKANSKI et al., 2001).

A literatura relata diferentes metodologias para o preparo de eletrodos à base de carbono, em formas de tintas. Pradela-Filho e colaboradores (PRADELA-FILHO et al., 2020) relatam a produção de tinta condutora de grafite, utilizando uma mistura de verniz vitral e grafite na proporção de 1:1 (m:m), com 500  $\mu\text{L}$  de acetona para homogeneização da tinta. Essa tinta foi depositada sobre substrato de papel e PET até a secagem completa por 24h. A utilização dessa tinta condutora implica vantagens como baixo custo de produção, boa condutividade do material e aderência na superfície do substrato. Em outro trabalho, Decoro e colaboradores (DEROCO et al., 2020) reportam a fabricação de um sensor impresso com tinta condutora de grafite modificada com negro de fumo, para detecção de capsaicina. A tinta de carbono foi modificada com pó de negro de fumo, misturando-se uma quantidade em massa de 1,0 g de negro de fumo (10% m/m) com 9,0 g de tinta de grafite. A mistura foi homogeneizada manualmente por 30 min., sendo armazenada no refrigerador, para posterior aplicação. Esta modificação da tinta de grafite proporcionou um aumento na atividade electrocatalítica do sensor impresso, se comparado com o não modificado.

No entanto, as reações eletroquímicas decorrentes na superfície destes eletrodos podem ocorrer de forma mais lenta se comparados com os eletrodos metálicos, o que pode ser explicado que a transferência de elétrons ocorre dependente da estrutura dos alótropos de carbono na superfície do sensor. Logo, foram desenvolvidos muitos tratamentos de limpeza da superfície destes dispositivos, que garantem uma área superficial renovada, estável e reprodutível. Algumas das técnicas de pré-tratamentos de eletrodos de carbono são polimento mecânico, limpeza com solvente, polarização eletroquímica, tratamento térmico a vácuo e tratamento térmico baseado a laser (MUZYKA et al., 2019; SOUZA, et al., 2019).

Dorraji e Jalali (DORRAJI; JALALI, 2016) desenvolveram um sensor eletroquímico de carbono vítreo modificado com um filme polimérico, para a detecção de Aciclovir (droga antiviral). Inicialmente, o ECV foi polido em um micro tecido utilizando alumina, e em seguida foi colocado em meio de etanol e água no ultrassom por 2 minutos. Após seu polimento, o ECV foi submetido ao pré-tratamento eletroquímico, utilizando Voltametria Cíclica, no qual aplicou-se um potencial entre -0,4V a +1,5V em ácido sulfúrico 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  com velocidade de varredura de 100  $\text{mV s}^{-1}$ . Na sequência, nas mesmas condições, o ECV foi submetido em NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  para obter seu pré-tratamento. Logo, em condições otimizadas, observaram que a modificação do ECV apresentou resultados de eletrooxidação

do analito com LOD de  $12 \text{ nmol L}^{-1}$ , obtido a partir da construção de duas curvas de calibração de  $0,03 - 0,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,3 - 1,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , por meio da técnica VPD em meio de tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Ademais, aplicaram o ECV modificado em amostras reais de soro sanguíneo e formulações farmacêuticas, sendo que o sensor demonstrou bons resultados de seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade.

De modo semelhante, Ye e colaboradores (YE et al., 2014) reportam o desenvolvimento de um método eletroquímico utilizando ECV para determinação de jatrorrizina. Para o pré-tratamento do ECV, foi realizado o polimento da superfície usando uma lixa mais fina e pasta de alumina de  $0,5 \text{ } \mu\text{m}$ . Após enxaguar abundantemente com água, o ECV foi colocado no álcool em ultrassom, e enxaguado com água destilada. Posteriormente, um pré-tratamento eletroquímico foi realizado no ECV, utilizando a técnica de voltametria cíclica em pH 7,0 no tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , variando numa faixa de potencial de  $0,1\text{V}$  a  $1,0\text{V}$  (20 ciclos). Por meio de condições otimizadas obtiveram LOD de  $50 \text{ nmol L}^{-1}$ , com faixa linear analítica de  $7,0 \times 10^{-8} - 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . O estudo foi aplicado em amostra farmacêutica, comprovando a boa seletividade e sensibilidade do ECV pré-tratado eletroquimicamente.

A fim de elevar a resposta eletroquímica, os sensores podem ser modificados a fim de se tornarem materiais mais condutores e que permitir a obtenção de melhores estabilidades de superfície, seletividade das espécies reduzidas e oxidadas, principalmente quando se trata de concentrações consideravelmente baixas. Conforme os trabalhos citados e diversos estudos, os modificadores químicos são essenciais para permitir que as reações na interface solução/eletrodo ocorram de forma mais rápida, agindo como catalisadores no transporte de massa até a superfície do eletrodo. Alguns modificadores como líquidos iônicos, solventes eutéticos, materiais carbonáceos, óxidos metálicos, materiais magnéticos possuem uma alta condutividade e estabilidade devidas as suas interações intermoleculares, permitindo melhorar a condutividade do material modificado mantendo as propriedades químicas e físicas do mesmo (CAMPUZANO; YÁÑEZ-SEDEÑO; PINGARRÓN, 2016; RENEDO, et al., 2007; SIDDEEG et al., 2020).

As modificações de sensores podem ocorrer por meio de adsorção física ou química, sendo depositadas (micro)camadas do modificador na superfície do eletrodo, e as reações ocorrerão pelas interações da superfície modificada com os sítios ativos das moléculas redox envolvidas na solução (SHERIGARA; KUTNER; D'SOUZA, 2003).

Na busca por novas formas de construção de sensores eletroquímicos, as novas tecnologias permitem cada vez mais o avanço no desenvolvimento de dispositivos mais sensíveis e com elevada detectabilidade de várias espécies. Isto inclui eletrodos impressos, que são materiais de baixo custo, reproduzíveis e confiáveis que oferecem análise portátil com monitoramento em tempo real. A miniaturização dos dispositivos eletroanalíticos, levando em consideração o tamanho e a área geométrica dos eletrodos, permite uma redução no volume de reagentes resultando em medições mais baratas e com menor impacto ambiental, pois gera menos resíduos. Muitos desses eletrodos possuem uma configuração completa, incluída pelo conjunto de três eletrodos impressos em um substrato inerte, que pode ser facilmente descartado (BEITOLLAHI et al., 2020; HART et al., 2004). A Tabela 1 reporta alguns trabalhos onde os eletrodos impressos são aplicados em amostras reais para detecção de diferentes tipos de analitos.

Cabe mencionar também que, a composição da tinta comumente usada para impressão dos eletrodos impressos pode ser diversificada pela adição de diferentes tipos de modificadores, como enzimas para biossensores, polímeros e agentes complexantes, os quais aumentam a seletividade e a sensibilidade de acordo com análise específica de uma amostra. Com isso, as novas possibilidades de design e fabricação dos eletrodos, com a incorporação de diferentes tipos de modificadores em diferentes sensores, os tornam sistemas altamente sensíveis, aumentando a capacidade de aplicação em nível biológico, ambiental e clínico, uma vez que a miniaturização destes dispositivos pode apresentar vantagens sinérgicas em eletroanálises químicas (MOHANKUMAR et al., 2021).

Tabela 1. Aplicações de eletrodos impressos em amostras biológicas, farmacêuticas e ambientais.

<b>Eletrodo impresso (EI) / modificadores</b>	<b>Analito</b>	<b>Técnica</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Referências</b>
EI de grafite não modificado	Ácido salicílico	VOQ	16 – 300	5,6	Urina humana	(RAWLINSON et al., 2018)
EI de carbono / nanopartículas de ouro	Ácido ascórbico	VPD / AMP	1,9 – 16,6	-	Sérum humano	(ALONSO-LOMILLO et al., 2017)
EI de carbono / Compósito de grafite/náfion	Dopamina	VL	0,5 – 70	0,023	Cloridrato de dopamina (injeção)	(KU; PALANISAMY; CHEN, 2013)
EI de carbono / nanocubos de óxido de ferro	Meclizina	VPD	0,33 – 29,13	0,080	Comprimidos / urina humana	(KHORSHEID; KHAIRY; BANKS, 2018)
EI de grafite / líquido iônico	Dopamina	VPD	1,0 – 2500	0,5	Ampolas de dopamina	(PING; WU; YING, 2010)
EI / nanocubos de $\text{La}^{+3}/\text{Co}_3\text{O}_4$	Vitamina B9	VL / VPD	1,0 – 600	0,3	Comprimidos / urina	(AFLATOONIAN et. al., 2020)
EI de grafite / óxido de níquel	Paration	VPD	0,1 – 30	0,024	Suco de tomate / Urina	(KHAIRY; AYOUB; BANKS, 2018)
EI e ECV não modificados	3,4- metilnodioxipirovalenora	VPDads	0,2 – 100	0,5	Amostras apreendidas	(LIMA et al., 2020)
EI / nanopartículas de ouro e MIP	Glicerol	VPD	201 – 2299	0,01	Esgoto	(MOTIA et al., 2020)
EI de carbono / MIP	Azitromicina	VPD	0,5 – 10	0,08	Água de torneira / água de rio	(REBELO et al., 2020)
EI de carbono grafite	Quercetina / Carbendazim	VPD	0,1 – 1,0	0,0518 / 0,060	Vinho	(RAYMUNDO- PEREIRA et al., 2020)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolvimento um eletrodo impresso de papel com tinta condutora de grafite dopado com Carbono Printex 6L e solvente eutético para a detecção e quantificação dos hormônios E2 e P4.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- (i) Estudar a caracterização morfológica, estrutural e eletroquímica dos eletrodos impressos de papel;
- (ii) Estudar a proporção de aglomerante (verniz) e material carbonáceo (grafite em pó) para tinta condutora;
- (iii) Estudar a reprodutibilidade e repetibilidade do EIP em função da aplicação dos eletrodos;
- (iv) Avaliar o comportamento eletroquímico dos analitos E2 e P4;
- (v) Avaliar os mecanismos de oxidação para E2 e P4 frente ao EIP;
- (vi) Estudar os interferentes dos analitos e obter quantitativamente as recuperações em amostras reais;
- (vii) Estudar a aplicação de E2 e P4 em amostras de urina sintética, saliva artificial e água mineral;
- (viii) Estuda a validação do método.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e soluções

E2 e P4 foram adquiridos da Sigma Aldrich e suas soluções estoques foram preparadas utilizando 10 mg e dissolvidos em 10 mL de etanol (Sigma Aldrich). Uma solução de tampão fosfato (PBS) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, foi usada como eletrólito suporte. A mistura foi feita com a dissolução dos sais fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) (Dinâmica) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) (Dinâmica). Os pHs foram ajustados com a solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Vetec).

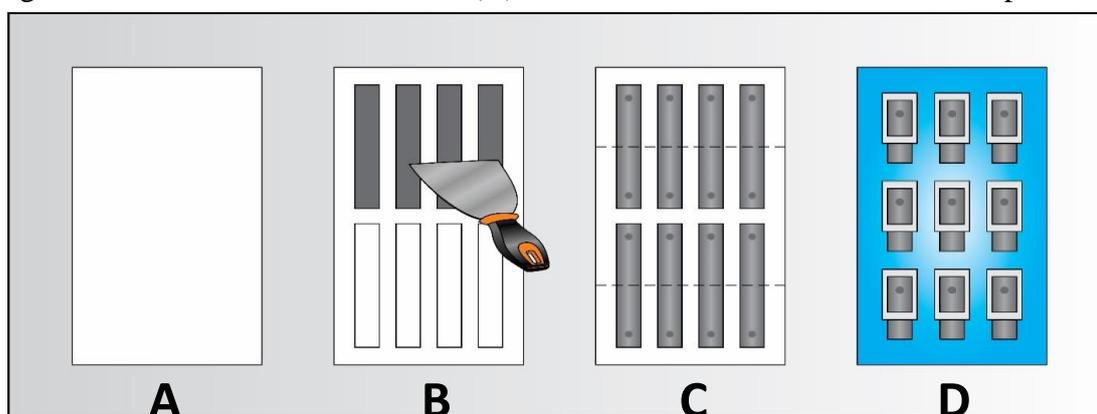
Para o preparo do EIP, foram utilizados grafite em pó (Dinâmica) como material carbonáceo, verniz vitral (Acrilex) como aglomerante e acetona (Impex) para a dissolução da tinta de carbono. Como substrato, foi utilizado papel “A4” com dimensões de 3,0 cm x 1,0 cm (210 x 297 mm; gramatura de 75 g m<sup>2</sup>; cor branca). Cloreto de potássio (KCl) (Pro Químios), ferricianeto de potássio (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) (Sigma Aldrich) e ferrocianeto de potássio trihidratado (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O (Neon) foram utilizados para o estudo da caracterização eletroquímica do EIP não dopado, EIP modificado com carbono Printex 6L (EIP-CP6L) e EIP modificado com carbono Printex 6L+SE (EIP-CP6L<sub>SE</sub>). Para os testes de recuperação do E2 e P4 foram estudadas diferentes matrizes, tais como: saliva artificial e diferentes amostras de águas minerais; sendo adquiridas em comércio local. Neste estudo, utilizou-se também a urina sintética, e esta foi preparada por meio de uma mistura das soluções de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O), sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) com concentração equimolar de 60 mmol L<sup>-1</sup> (TRIVIÑO et al., 2019; WONG et al., 2019). Todos os reagentes foram usados sem purificação adicional, e utilizou-se a água ultrapura (Millipore Milli-Q 18,2 MΩ cm).

### 4.2 Preparação dos eletrodos impressos de papel

De acordo com a metodologia proposta por Pradela-Filho e colaboradores, para o desenvolvimento deste trabalho, optou-se pela produção da tinta de grafite preparada por meio da mistura de 50% de grafite (G) em pó com 50% verniz vitral (V) (mG/vV), e misturados com 800 µL de acetona até sua completa homogeneização. Na sequência, foi utilizado uma espátula para a adesão das camadas da tinta de carbono sobre o substrato de papel até a sua secagem completa a temperatura ambiente controlada (~ 25°C) por um período de 1h (Figura

2). A secagem à temperatura ambiente proporcionou melhor compactação da tinta no substrato de papel, evitando o craquelamento que ocorre com a exposição em temperaturas acima de 100 °C, e a proporção de acetona utilizada permitiu uma secagem mais rápida, ajudando na compactação da tinta sobre o substrato (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2011). Delimitou-se a área exposta do EIP ( $\langle \varnothing \rangle = 3$  mm) revestindo-o com um adesivo impermeável para evitar a absorção de água pelo substrato.

Figura 2. Etapas da construção dos eletrodos impressos de papel: (A) substrato de papel, (B) adesão da tinta de grafite sobre o substrato e compactação com a espátula, (C) delimitação da área geométrica e do tamanho do EIP e (D) recobrimento do EIP com adesivo impermeável.



A partir desta etapa, foi realizado o estudo da otimização da tinta de grafite em diferentes proporções de grafite:verniz (mG/vV), tais como 40%/60%, 50%/50% e 60%/40%. Outro parâmetro estudado foi a otimização do número de camadas (1 a 4) sobre a superfície do substrato de papel, a fim de verificar a eficiência em aumentar a resposta eletroquímica das espécies de interesse.

Para o estudo da dopagem do EIP, utilizou-se uma mistura na proporção de 2,5:1 (m/v) de carbono Printex 6L (Degusa) (EIP-CP6L) com água ultrapura. A dopagem do EIP também foi realizada com a adição de 10  $\mu$ L de SE à mistura de carbono Printex 6L e água ultrapura (EIP-CP6L<sub>SE</sub>). Para a completa homogeneização, a mistura foi colocada no ultrassom por 30 min., e seguida depositada à superfície do EIP um volume de 7  $\mu$ L. As medidas eletroquímicas foram realizadas após a secagem completa da microcamada a  $\sim 25$  °C.

Para o preparo do SE, foram utilizados cloreto de benziltriethylamônio (BTEAC) ( $C_6H_5CH_2N(Cl)(C_2H_5)_3$ ) e ácido malônico (AM) ( $C_3H_4O_4$ ), ambos da Sigma Aldrich (FLORINDO et al., 2014). A massa correspondente a BTEAC e AM, na razão molar apropriada, foi adicionada em um frasco de fundo redondo sob agitação magnética de 15 min. a 100 °C. Após esse tempo, o SE foi deixado em repouso até que esfriasse à temperatura ambiente e permanecesse na forma líquida. A caracterização do SE foi proposta por Paveglio

e colaboradores (PAVEGLIO et al., 2021), sendo realizada pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a fim de identificar os grupos funcionais presentes nos compostos de partida.

### 4.3 Caracterização dos eletrodos impressos de papel

A fim de verificar a morfologia do EIP, EIP-CP6L e EIP-CP6L<sub>SE</sub>, foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um microscópio eletrônico de varredura modelo Phenom ProX com tensão de voltagem de 10 kV e 15kV. Previamente, as amostras do EIP, EIP-CP6L e EIP-CP6L<sub>SE</sub> foram construídos com dimensões de 1,0 x 1,0 cm. Posteriormente, estes foram condicionados no porta-amostra, sem necessidade de recobrimento ou metalização do material. A partir disto, as amostras foram adicionadas no detector, obtendo-se micrografias em diferentes pontos.

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foi aplicada para avaliar as propriedades físicas e elétricas da interface eletrodo/solução no sistema eletroquímico. Os estudos foram realizados usando o módulo FRA2 no *software* NOVA 2.1 em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo par redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 mmol L<sup>-1</sup>. Os parâmetros eletroquímicos neste estudo foram otimizados, tais como, faixa de frequência de 0,01 Hz a 50 KHz (10 pontos por década) com amplitude de 10 mV (r.m.s.). Para este estudo, foram avaliados o EIP nas diferentes proporções de grafite:verniz (mG/vV) e o EIP-CP6L<sub>SE</sub>. Gráficos de Nyquist foram obtidos usando o *software* Zview.

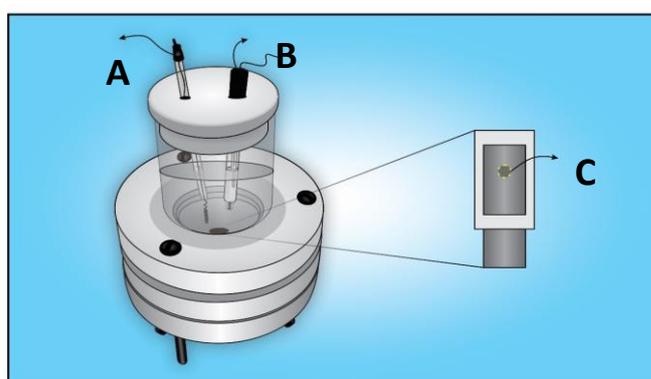
Para a caracterização estrutural dos eletrodos, foram realizadas as análises das amostras, usando o espectrômetro de FTIR Jasco, modelo 4100, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, variando a faixa de comprimento de onda entre 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, aplicando o método de disco de KBr. Foram preparadas as amostras de grafite em pó, grafite com verniz, carbono Printex 6L e carbono Printex 6L com SE, levando em consideração os parâmetros técnicos do equipamento. Estas amostras foram colocadas na estufa a ~60 °C, por um período de 48h, a fim de eliminar possíveis interferências de umidade. Em seguida, as amostras foram maceradas e prensadas com KBr.

Análises de microscopia óptica (MO) também foram realizadas. Para estas análises, foram preparados previamente as amostras de grafite em pó, carbono Printex 6L em pó, carbono Printex 6L com SE, EIP, EIP-CP6L e EIP-CP6L<sub>SE</sub>. Na sequência, as amostras foram posicionadas em lâminas lisas não lapidadas (tamanho 26x76mm; espessura de 1 – 1,2 mm), e adicionadas no Microscópio Óptico Nikon Eclipse E200.

#### 4.4 Sistema eletroquímico e detecção de E2 e P4

As medidas eletroquímicas foram realizadas por meio das técnicas de voltametria cíclica (VC) e de pulso diferencial (VPD), utilizando o potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 302N, acoplado ao computador contendo o *software* NOVA 2.1.1<sup>®</sup>. O sistema eletroquímico (Figura 3) foi composto por uma célula eletroquímica com capacidade volumétrica de 100 mL, onde foram inseridos os eletrodos: referência Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub>, auxiliar fio de platina e eletrodo impresso de papel como trabalho.

Figura 3. Representação esquemática da célula eletroquímica composta pelo (A) eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub>, (B) eletrodo auxiliar fio de platina e (C) eletrodo de trabalho EIP.



Os estudos de caracterização por VC do EIP e EIP-CP6L<sub>SE</sub> foram realizados em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo o par redox Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 mmol L<sup>-1</sup>. Os parâmetros eletroquímicos utilizados foram: faixa de potencial de -0,2V - +0,8V e velocidade de varredura entre 1 – 500 mV s<sup>-1</sup>.

Para a detecção de E2 e P4 foram realizados estudos em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> por VPD, sendo os parâmetros da técnica previamente otimizados, como mostra a Tabela 2. Estudos com a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) foram realizados. Porém, mesmo após a otimização dos parâmetros, esta não se apresentou adequada para detecção dos analitos. Assim, optou-se pela técnica VPD, que apresentou melhor detectabilidade e resolução dos picos de oxidação para ambos os hormônios nas diferentes concentrações estudadas.

Tabela 2. Otimização dos parâmetros da Voltametria de Pulso Diferencial para detecção de E2 e P4.

Parâmetros	Intervalos estudados	Condições otimizadas (E2)	Condições otimizadas (P4)
Intervalo de pulso ( $\tau$ / mV)	1 – 10	4 mV	4 mV
Amplitude de potencial de pulso ( $\Delta E$ / mV)	10 – 100	50 mV	60 mV
Tempo de modulação de pulso (t / s)	0,01 – 0,1	0,04 s	0,05 s
Intervalo de tempo ( $\Delta t$ / s)	0,1 - 1	0,5 s	0,5 s

Após a otimização de todos os parâmetros, foi realizado o estudo de detecção do E2 e P4 por VPD, construindo-se curvas analíticas com faixas lineares para o E2 de 0,00732 – 0,417  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,0009 – 0,21  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o EIP e EIP-CP6L<sub>SE</sub>, respectivamente. As faixas lineares para P4 foram de 0,009 - 0,812  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (EIP) e 0,0008 - 0,05  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para EIP-CP6L<sub>SE</sub>. A faixa linear foi determinada levando em consideração a sensibilidade e estabilidade da resposta eletroquímica.

A fim de elucidar o mecanismo de transporte de massa do E2 e P4 na superfície do eletrodo, foram realizados estudos por VC na faixa de potencial de +0.2 V - +1.0 V e velocidade de varredura 10 a 100  $\text{mV s}^{-1}$ . Realizou-se também o estudo da otimização do pH em PBS 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , cuja concentração do E2 e P4 foi  $7,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $7,95 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Para a avaliação da seletividade do sensor na presença de outros compostos interferentes (ácido ascórbico - AA, cafeína - CAF, 17 $\alpha$ -etinilestradiol – EE2 e losartana potássica - LOS), os experimentos foram realizados individualmente para cada hormônio. Para este estudo, a proporção estudada interferentes e analito foi de 1:2.

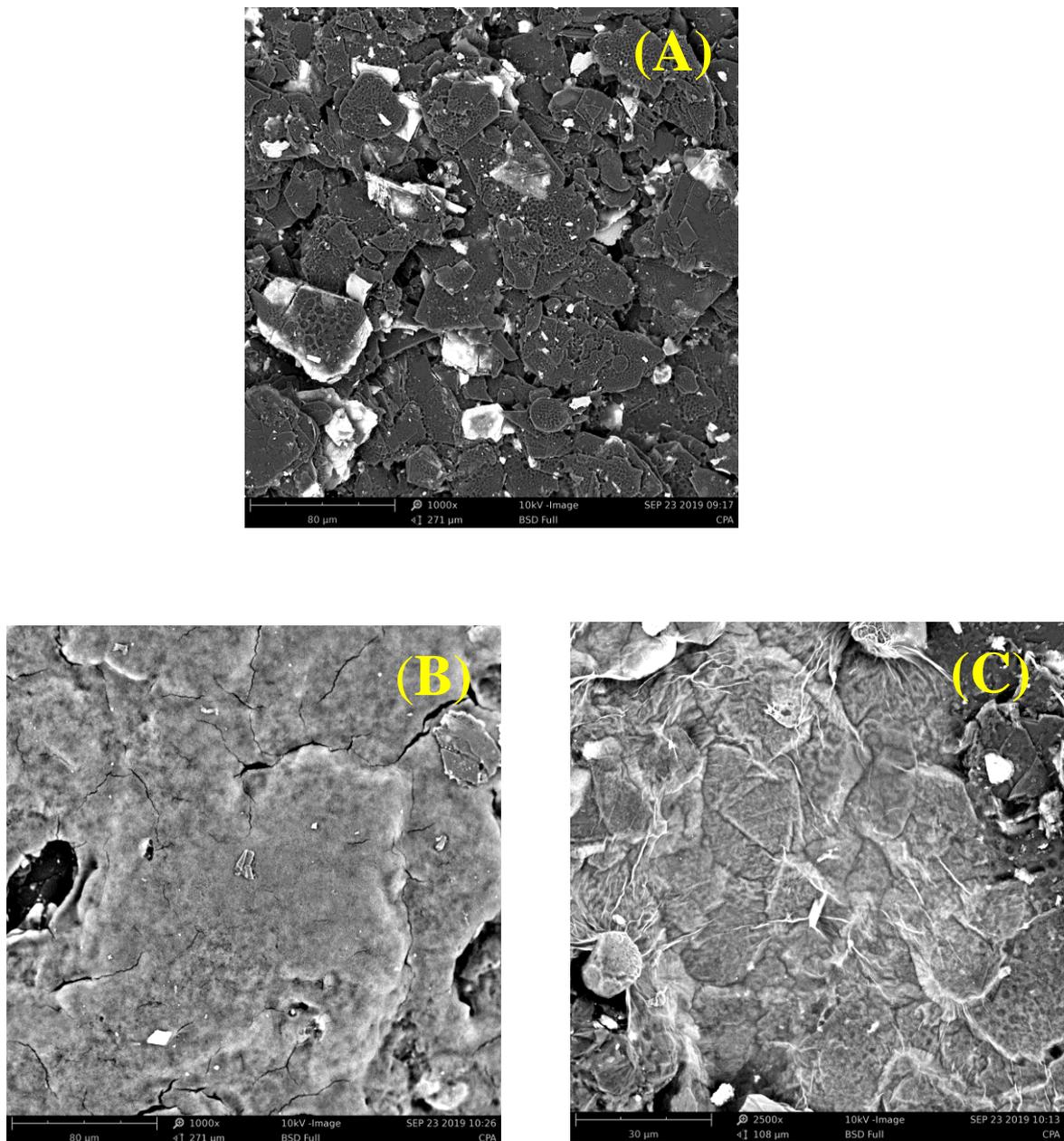
Realizaram-se também por VPD, testes de recuperação do E2 e P4 em três tipos diferentes de amostras (saliva artificial, água mineral e urina sintética), além do estudo comparativo com espectroscopia de UV-VIS (espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary-50). A urina sintética foi preparada por meio de uma mistura das soluções de NaCl, KCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  com concentração equimolar de 60  $\text{mmol L}^{-1}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização morfológica e estrutural dos eletrodos impressos de papel

A caracterização morfológica dos eletrodos foi avaliada por MEV, e as imagens microscópicas são apresentadas na [Figura 4](#).

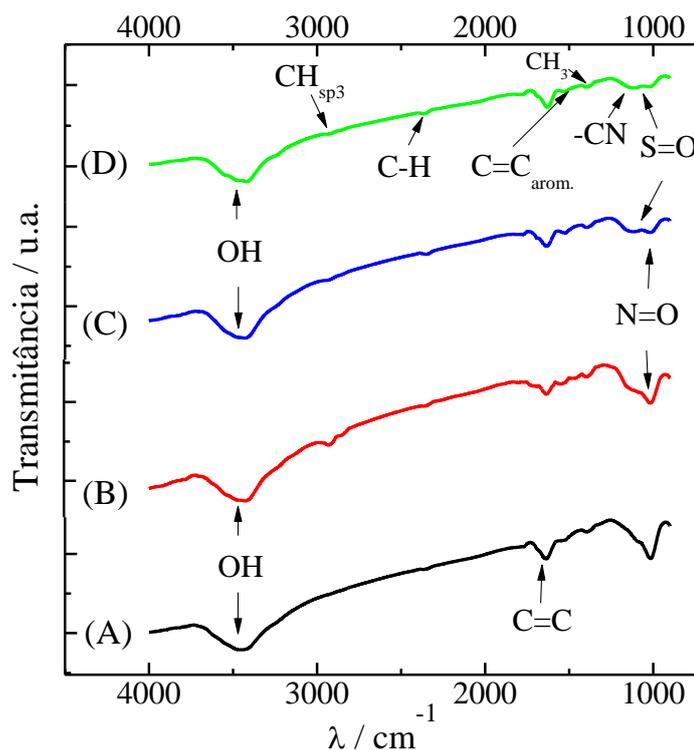
Figura 4. Imagens obtidas por MEV dos diferentes eletrodos impressos de carbono: (A) EIP-2G (50mG/50vV), (B) EIP-CP6L e (C) EIP-CP6L<sub>SE</sub>.



Pode-se observar na [Figura 4A](#) que a tinta de grafite depositada sobre a superfície do papel tem característica lamelar e aglomerada, apresentando pequenos flocos irregulares. Nota-se também que existem pequenos pontos (brancos) distribuídos na superfície do eletrodo, provavelmente devido ao efeito de carregamento, que ocorre quando as amostras não recebem um recobrimento metálico para melhorar sua condução, havendo então um acúmulo de cargas negativas na superfície do material proporcional à varredura do feixe. A [Figura 4B](#) mostra o EIP modificado somente com carbono Printex 6L (EIP-CP6L), e verifica-se que houve uma elevada compactação da microcamada na tinta de grafite resultando em uma superfície homogênea. A partir da micrografia mostrada na [Figura 4C](#), que corresponde ao EIP-CP6L<sub>SE</sub>, é possível ver um pequeno filme distribuído uniformemente ao longo do carbono Printex 6L apresentando uma superfície rugosa. Isto provavelmente se deve à mistura do SE ao material carbonáceo, favorecendo morfologicamente o aumento da área superficial do EIP.

As análises de espectroscopia de FTIR fornecem dados sobre os principais grupos funcionais existentes nas amostras. A [Figura 5](#) mostra os espectros de infravermelho do (A) grafite, (B) grafite com verniz, (C) carbono Printex 6L e (D) carbono Printex 6L dopado com SE.

Figura 5. Espectros de infravermelho obtidos para as amostras de (A) grafite em pó, (B) grafite em pó com verniz vitral, (C) carbono Printex 6L e (D) carbono Printex 6L dopado com SE.



Para o espectro do grafite, observam-se bandas características de vibrações de alongamento de O–H em aproximadamente  $3.453\text{ cm}^{-1}$ , como também C=C em  $\sim 1.638\text{ cm}^{-1}$ , característica das ligações C=Csp<sub>2</sub> não oxidados. No entanto, o espectro do grafite apresenta poucos sinais de absorção, que pode ser explicada pela pequena diferença de estados de cargas entre os átomos de C, que caracteriza um pequeno dipolo elétrico induzido, o que torna o espectro sem características de ruídos. A amostra de grafite dopada com carbono Printex 6L, observa-se uma diferença explícita de bandas nos espectros (C) e (D), como as bandas de S=O ( $\sim 1.078\text{ cm}^{-1}$ ) características desse tipo de material carbonáceo (AFSHARI; DINARI; MOMENI, 2019; ASSUMPÇÃO et al., 2011).

O carbono Printex 6L, também apresenta bandas de ácidos oxigenados presentes em sua superfície, tais como, CO(H) e C<sub>2</sub>OH em  $\sim 1.100\text{ cm}^{-1}$ , o que explica o aumento do caráter hidrofílico do material. Ademais, observa-se também, uma banda menos intensa de N=O ( $\sim 1.021\text{ cm}^{-1}$ ) correspondente à amostra de grafite dopada com carbono Printex 6L. Com a adição de SE (D), observam-se bandas características de -CH<sub>3</sub> ( $\sim 1.400\text{ cm}^{-1}$ ), C=C aromático ( $\sim 1.519\text{ cm}^{-1}$ ), -C-N ( $\sim 1.136\text{ cm}^{-1}$ ), -C-Hsp<sub>3</sub> ( $\sim 2.918\text{ cm}^{-1}$ ) correspondentes ao cloreto de benziltriethylamônio, que compõe o SE. Nas Figuras 5C e 5D, também há uma banda de baixa intensidade em  $\sim 2.362\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída ao alongamento C–H devido à presença do grupo CH<sub>2</sub>–CO, correspondente ao carbono Printex 6L (PAVEGLIO et al., 2021; RODIL, 2005).

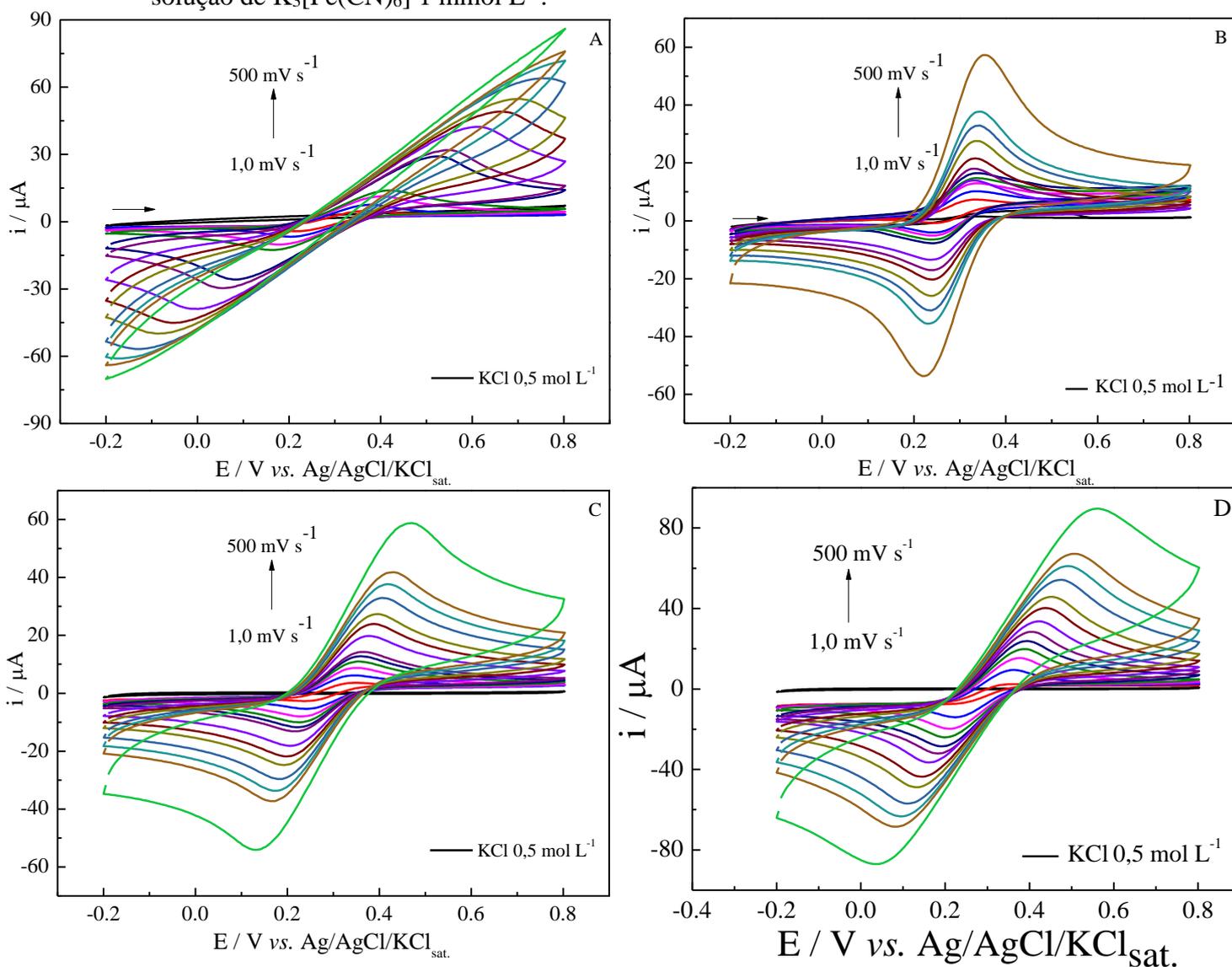
Posteriormente, foram realizadas análises de Microscopia Óptica para avaliar a morfologia dos materiais carbonáceos (grafite em pó e carbono Printex 6L em pó), da tinta dopante composta por carbono Printex 6L com SE, bem como EIP, EIP-CP6L e EIP-CP6L<sub>SE</sub> (Apêndice A, Figuras A1 a A4). A micrografia do grafite em pó (Figura A1) mostra que sua morfologia apresenta um aspecto lamelar e aglomerado. O carbono Printex 6L apresenta estruturas aparentemente esferoidais e aglomeradas, porém mais espessas (Figura A2). No entanto, ao dopar o carbono Printex 6L com SE, (Figura A3) ocorre um melhor espalhamento do material carbonáceo na tinta. Assim, as micrografias de EIP-CP6L apresentam aumento da rugosidade, quando modificado com a tinta contendo o dopante, bem como em EIP-CP6L<sub>SE</sub> estende-se uma espécie de fibra longitudinal no material, o que indica a interação entre o carbono Printex 6L e o SE (CAO et al., 2018; HAJAR et al., 2017; MA et al., 2019).

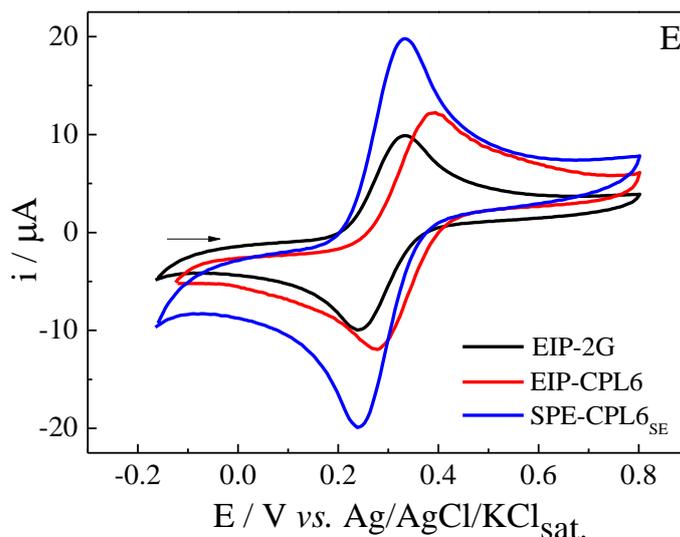
## 5.2 Caracterização eletroquímica dos eletrodos impressos de papel

### 5.2.1 Estudo do número de camadas de tinta de grafite e modificação do EIP

Inicialmente foi realizado o estudo da influência do número de camadas de tinta de grafite sobre a superfície do substrato de papel. A Figura 6 mostra os voltamogramas cíclicos do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  para os eletrodos, variando o número de camadas de tinta de grafite (50%/50%, mG/vV), bem como a comparação do comportamento eletroquímico destes eletrodos.

Figura 6. Voltamogramas cíclicos com as velocidades de varredura de 1 a 500  $\text{mV s}^{-1}$  para estudo de camadas de tinta de grafite no EIP, variando em (A) 1 camada de tinta de grafite, (B) 2 camadas de tinta de grafite, (C) 3 camadas de tinta de grafite e (D) 4 camadas de tinta de grafite e o (E) comparação dos eletrodos sem e com a modificação do EIP-2G (50mG/50vV) com carbono Printex 6L + SE. As medidas foram realizadas em  $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$  contendo solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ .





Pela equação de Randles-Sevick (Eq.1) (BARD; FAULKNER, 2001), foi calculada o efeito de área eletroativa (área real) dos eletrodos e estes dados são mostrados na Tabela 3. O estudo da % real comparado à área geométrica foi calculado pela razão  $(A_{\text{real}} / A_{\text{geométrica}}) \times 100$  (FERRARI et al., 2018).

$$I_p = \pm(2.69 \times 10^5)n^{3/2}A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (1)$$

onde:

$I_p$  é a corrente de pico anódica;

$n$  é o número de elétrons transferidos;

$A$  é a área eletroativa (área real) do eletrodo impresso ( $\text{cm}^2$ );

$D$  é o coeficiente de difusão do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$  ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ );

$C$  é a concentração do  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ( $\text{mol L}^{-1}$ );

$v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ).

Tabela 3. Estudo dos critérios de reversibilidade para o EIP (1 a 4 camadas de tinta de grafite), EIP-CP6L (2 camadas de tinta de grafite) e EIP-CP6L<sub>SE</sub> (2 camadas de tinta de grafite) em KCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

Eletródos (50mG/50vV)	Área real / $\text{mm}^2$	%real*	$i_{pa}/i_{pc}$	$\Delta E_p$ / mV	$E_{1/2}$ / mV	$k^0$ / $\text{cm s}^{-1}$
EIP - 1G	Irreversível	-	1,07	608,47	304,24	Irreversível
EIP - 2G	9,84	139,27	1,04	90,63	283,35	$4,74 \times 10^{-5}$
EIP - 3G	12,96	183,43	1,09	175,97	291,63	$3,10 \times 10^{-5}$
EIP - 4G	22,11	312,95	0,92	257,14	291,63	$2,85 \times 10^{-5}$
EIP-CP6L	8,01	113,38	1,02	136,02	328,50	$1,63 \times 10^{-3}$
EIP-CP6L <sub>SE</sub>	18,68	264,40	1,02	115,81	336,23	$6,94 \times 10^{-4}$

$$*\%_{\text{real}} = (A_{\text{real}} / A_{\text{geométrica}}) \times 100$$

Observa-se que ocorreu um aumento da resposta eletroquímica para o par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  a partir da adição de mais camadas de tinta de grafite na superfície do eletrodo, resultando no aumento do efeito da área de contato, assim como também houve aumento na condutividade do eletrodo. Os valores de % real obtidos foram 139,27 e 264,40 para o EIP – 2G e EIP-CP6L<sub>SE</sub>, respectivamente. Nota-se que os valores ultrapassam 100%, provavelmente devido ao tipo de aglutinante (verniz vitral) utilizado para a tinta de grafite depositada no papel.

O aumento do efeito de área pode ser explicado pelas reações de esfera externa e interna, que ocorrem pela taxa de transferência de elétrons do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  com a superfície do eletrodo. No entanto, as reações de esfera externa são aquelas que não ocorre interação direta com eletrodo, pois estas são destacadas como reações que ocorrem entre complexos ou compostos de coordenação que não são adsorvidos na superfície do eletrodo (estão na interface solução/eletrodo). As reações de esfera interna estão diretamente adsorvidas na superfície do eletrodo, determinando assim o aumento do efeito de área do eletrodo (BARD; FAULKNER, 2001).

Realizou-se também o estudo da taxa de transferência de elétrons (Tabela 3), e este foi calculado pela equação de Nicholson (Eq. 2) e Lavagnini (Eq. 3) (LAVAGNINI; ANTIOCHIA; MAGNO, 2004; NICHOLSON, 1965). De acordo com os valores obtidos de  $k^0$ , os eletrodos contendo 3 e 4 camadas de tinta de grafite, (assim como também é verificado pelos voltamogramas cíclicos) os processos redox se tornaram mais irreversíveis, o que pode explicar a diminuição da constante de taxa de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. No entanto, para o eletrodo que contém duas camadas de tinta de grafite, houve uma redução no valor de  $\Delta E_p$  (90,63 mV), como também apresenta maior valor de  $k^0$  ( $4,742 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ ) quando comparados com as demais camadas. Nesse sentido, escolheu-se o eletrodo com 2 camadas de tinta de grafite para os demais experimentos, inclusive para o estudo da detecção do E2 e P4.

$$\psi = k^0 [\pi D n v F / (R T)]^{-1/2} \quad (2)$$

$$\psi = (-0.6288 + 0.0021 \times \Delta E_p) / (1 - 0.017 \times \Delta E_p) \quad (3)$$

onde:

$\psi$  é um parâmetro cinético;

$k^o$  é constante de transferência de elétrons heterogênea;

$\pi$  é dado como 3,1415;

$n$  é o número de elétrons transferidos;

$\Delta E_p$  é a variação de potencial de pico;

$D$  é o coeficiente de difusão do  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$  ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ );

$\nu$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ );

$F$  é a constante de Faraday ( $96,485 \text{ C mol}^{-1}$ );

$T$  é a temperatura (Kelvin);

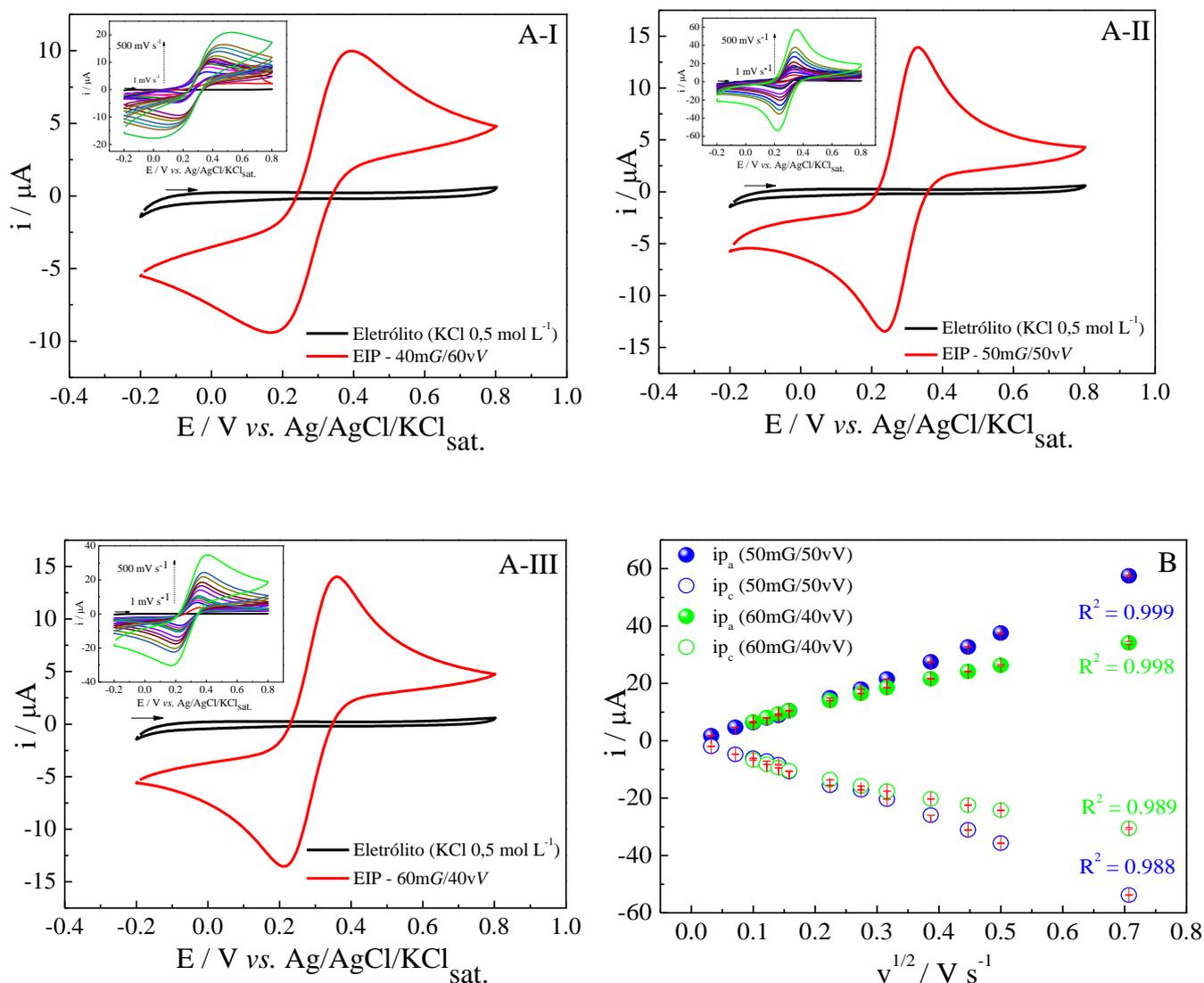
$R$  é a constante dos gases  $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

Os voltamogramas cíclicos do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$  são mostrados na [Figura 6E](#) para estudo da modificação do EIP. Houve um aumento na resposta de corrente de aproximadamente 2,0 vezes para o eletrodo EIP-CP6L<sub>SE</sub> em relação ao EIP, ou seja, houve maior condutividade elétrica na superfície do eletrodo, e um aumento da reversibilidade quando comparado com o EIP-CP6L. Este estudo é importante para avaliar a sensibilidade das espécies eletroativas em solução, assim como também a aplicação para a detecção do E2 e P4 em diversas amostras.

### 5.2.2 Estudo da variação da proporção de tinta de grafite

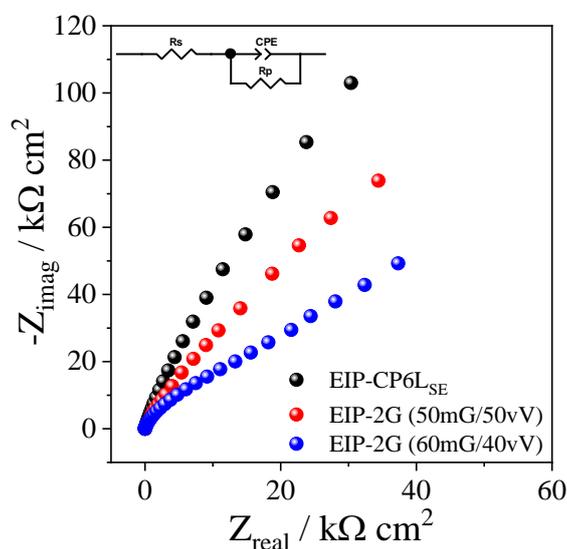
Realizou-se também o estudo da variação da composição de tinta de grafite e verniz, e os voltamogramas cíclicos do par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  em  $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com variação na velocidade de varredura entre 1 a  $500 \text{ mV s}^{-1}$  são mostrados na [Figura 7A](#). Os voltamogramas cíclicos mostrados na [Fig. 7AI-III](#), apresenta as diferentes proporções estudadas de grafite:verniz nas composições de 40mG/60vV, 50mG/50vV e 60mG/40vV, respectivamente. Os dados obtidos confirmam que o EIP contendo a proporção 50mG/50vV é mais reversível, provavelmente pela uniformidade da adesão da camada da tinta em relação à porosidade do papel, assim como também a mistura é mais homogênea e sem aglomerações. Como mostrado na [Figura 7B](#), nota-se que ocorre elevada linearidade ( $v^{1/2}$  versus  $i$ ) para os picos anódicos e catódicos, com valores de  $R^2 \sim 0,990$ .

Figura 7. (A) Voltamogramas cíclicos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  do estudo comparativo das proporções de tinta de grafite no EIP: (I) 40m de grafite/60v de verniz, (II) 50m de grafite/50v de verniz, (III) 60m de grafite/40v de verniz, (B) correlações lineares dos picos anódicos e catódicos para o EIP em 50m de grafite/50v de verniz e 60m de grafite /40v de verniz.



Com o objetivo de estudar a resistência dos eletrodos, realizaram-se experimentos de EIE. A caracterização eletroquímica do EIP foi estudada para as proporções 50mG/50vV, 60mG/40vV, e para o EIP-CP6L<sub>SE</sub>, estudou-se apenas a proporção 50mG/50vV. Neste estudo foram obtidos os gráficos de Nyquist em função das variações de frequências altas e baixas, como mostrado na Figura 8. O processo de transferência de elétrons foi avaliado em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1 mmol L<sup>-1</sup>.

Figura 8. Espectro de impedância eletroquímica em solução para os diferentes eletrodos: EIP-2G (50mG/50vV), EIP-2G (60mG/40vV) e EIP-CP6LP6L<sub>SE</sub>. As medidas foram realizadas em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo solução de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 1 mmol L<sup>-1</sup>.



Conforme os dados obtidos e mostrados na [Tabela 4](#), foram determinados os valores de constante de fase de transferência de elétrons (CPE<sub>t</sub>), sendo  $3,73 \times 10^{-3}$  e  $2,88 \times 10^{-3} \mu\text{F cm}^{-2}$  para o EIP 50mG/50vV e 60mG/40vV, respectivamente. Por outro lado, houve um aumento da CPE<sub>t</sub> ( $4,27 \times 10^{-2} \mu\text{F cm}^{-2}$ ) para o EIP-CP6L<sub>SE</sub>. Esse aumento nos valores das constantes de fase de transferência de elétrons está relacionado com a capacitância do material pela área do eletrodo ([CORDEIRO et al., 2019](#)).

Tabela 4. Valores dos elementos de circuito equivalente obtidos por EIE.

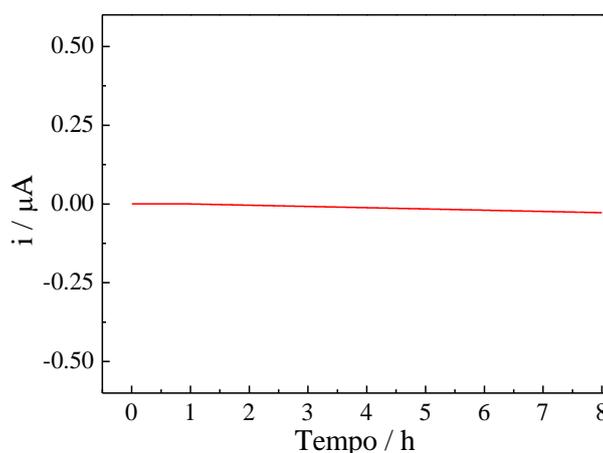
<b>Eletrodos</b>	<b>Rs (KΩ)</b>	<b>Rtc (KΩ)</b>	<b>CPE<sub>t</sub> (μF cm<sup>-2</sup>)</b>
EIP-2G (50mG/50vV)	0,01516	1,189	$3,73 \times 10^{-3}$
EIP-2G (60mG/40vV)	0,01522	1,478	$2,88 \times 10^{-3}$
EIP-CP6L <sub>SE</sub> (50mG/50vV)	0,00724	0,039	$4,27 \times 10^{-2}$

Por meio dos valores das resistências de transferências de cargas (Rtc) e resistências de solução (Rs) avaliados para os eletrodos EIP 50mG/50vV, 60mG/40vV e EIP-CP6L<sub>SE</sub> (50mG/50vV), observa-se que a modificação do eletrodo promoveu uma melhoria na condutividade da área superficial. Isso se dá pela diminuição drástica do valor de Rtc (0,039

K $\Omega$ ) para o eletrodo EIP-CP6L<sub>SE</sub> (50mG/50vV), já que com a diminuição dessa resistência ocorre a diminuição da resistência de solução (0,00724 K $\Omega$ ).

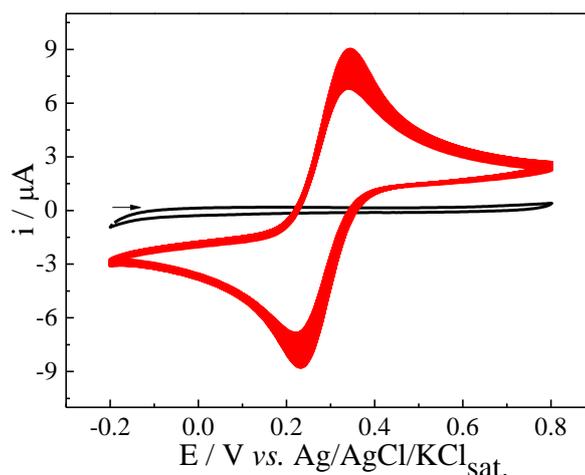
A fim de verificar a estabilidade eletroquímica do eletrodo EIP 50mG/50vV, foi realizado o estudo de cronoamperometria ( $E = +0,3$  V) por um período de 8h, conforme mostra a [Figura 9](#).

Figura 9. Estudo da estabilidade do EIP-2G (50mG/50vV) por cronoamperometria em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo 1 mmol L<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>. Potencial aplicado de +0,3V.



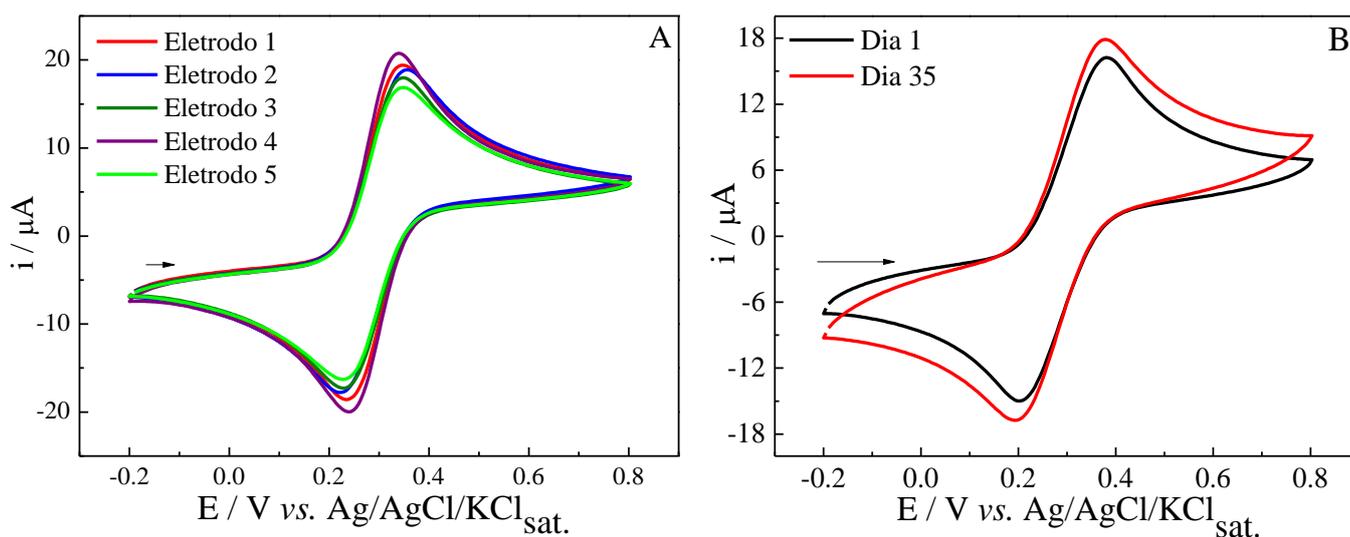
Observa-se que houve uma pequena oscilação de corrente (~2,0%) durante todo o processo de eletrólise, e isso pode ser comprovado pelos voltamogramas cíclicos (100 ciclos) mostrados na [Figura 10](#). Ainda assim, observou-se uma elevada estabilidade eletroquímica do material, sendo um indicativo que houve uma boa aderência da tinta de grafite na superfície do substrato de papel. Em outras palavras, observa-se também que este estudo confirma a elevado nível de repetibilidade cíclica para o EIP, havendo pouca mudança de corrente de pico, tal como mencionado anteriormente.

Figura 10. Voltamogramas cíclicos para estudo de repetibilidade no EIP 50mG/50vV em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (linha preta) contendo 1 mmol L<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> (linha vermelha). Total de 100 ciclos.



Posteriormente, também foram avaliados os estudos de reprodutibilidade deste eletrodo durante um mesmo dia (Figura 11A) utilizando diferentes eletrodos com a mesma configuração e durante 35 dias consecutivos (Figura 11B) com o mesmo eletrodo, respectivamente.

Figura 11. Voltamogramas cíclicos para estudo de reprodutibilidade (A) no mesmo dia (intraday) com diferentes eletrodos de mesma configuração e (B) em 35 dias consecutivos (interday) com único eletrodo para o EIP-2G (50mG/50vV) em KCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> contendo 1 mmol L<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>.



Com esses estudos, observou-se que para os experimentos com diferentes eletrodos de mesma configuração testados no mesmo dia, houve pequenas variações de intensidades de correntes ( $\sim 0,8\%$ ), o que não são significativas para interferir em posteriores resultados para

detecção de E2 e P4. Também, observou-se que para os estudos entre 35 dias consecutivos com um mesmo eletrodo, houve um pequeno deslocamento de  $+1,6 \mu\text{A}$  e  $-1,84 \mu\text{A}$  de corrente de pico anódica e catódica, respectivamente, quando comparado com o voltamograma obtido no 1º dia.

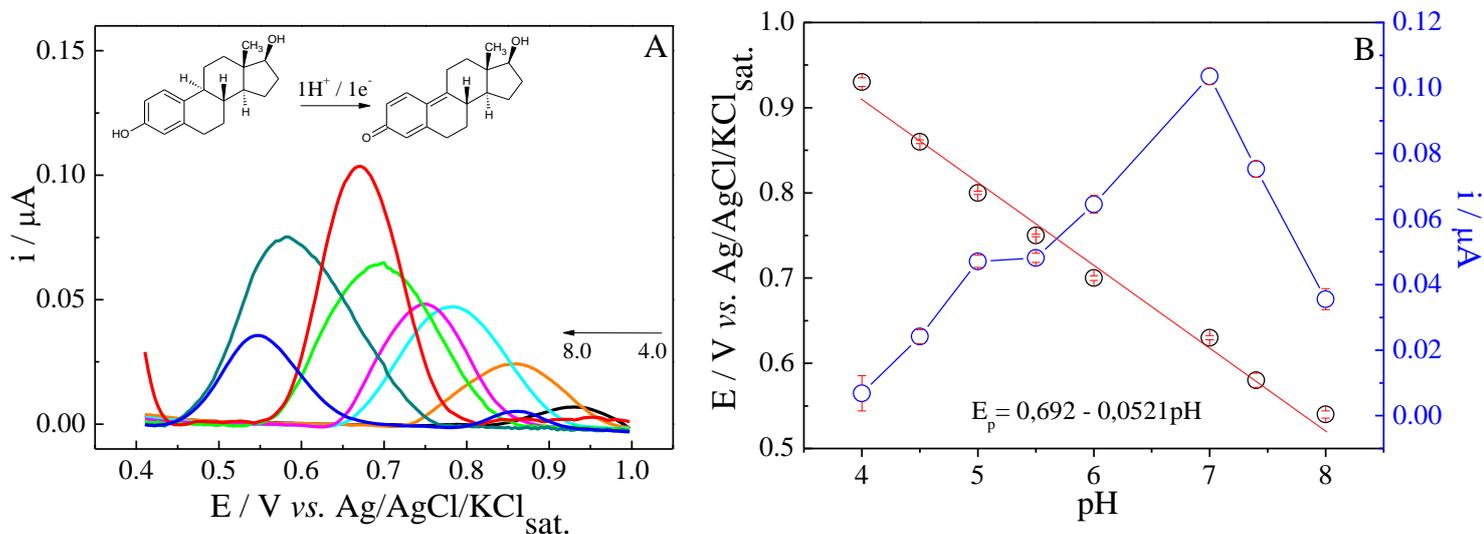
Diante dos dados obtidos a partir da caracterização eletroquímica dos eletrodos, e com o objetivo de averiguar a sensibilidade analítica na detecção de contaminantes emergentes, nas próximas seções serão discutidos os dados sobre os estudos realizados na detecção e quantificação de E2 e P4.

### 5.3 Aplicação do EIP para o estudo do comportamento eletroquímico do E2 e P4

#### 5.3.1 Estudo da influência do pH

O estudo de pH é um parâmetro importante e possui um papel crucial no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, indicando a melhor resposta em termos de corrente para a detecção dos analitos, ou seja, o pH do eletrólito suporte influencia diretamente na oxidação dos hormônios E2 e P4. Dessa forma, foi realizado em meio de PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , o estudo da influência do pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 7,4 e 8,0) para a detecção de  $7,32 \mu\text{mol L}^{-1}$  de E2 em uma faixa de potencial de  $+0,4 - +1,0 \text{ V}$  (Ag/AgCl/KCl<sub>sat.</sub>).

Figura 12. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo da influência do pH para detecção de E2 ( $7,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  usando EIP-2G (50mG/50vV). Inset: mecanismo eletroquímico de oxidação do E2. (B)  $\Delta I_p$  vs. pH e  $\Delta E_p$  vs. pH.



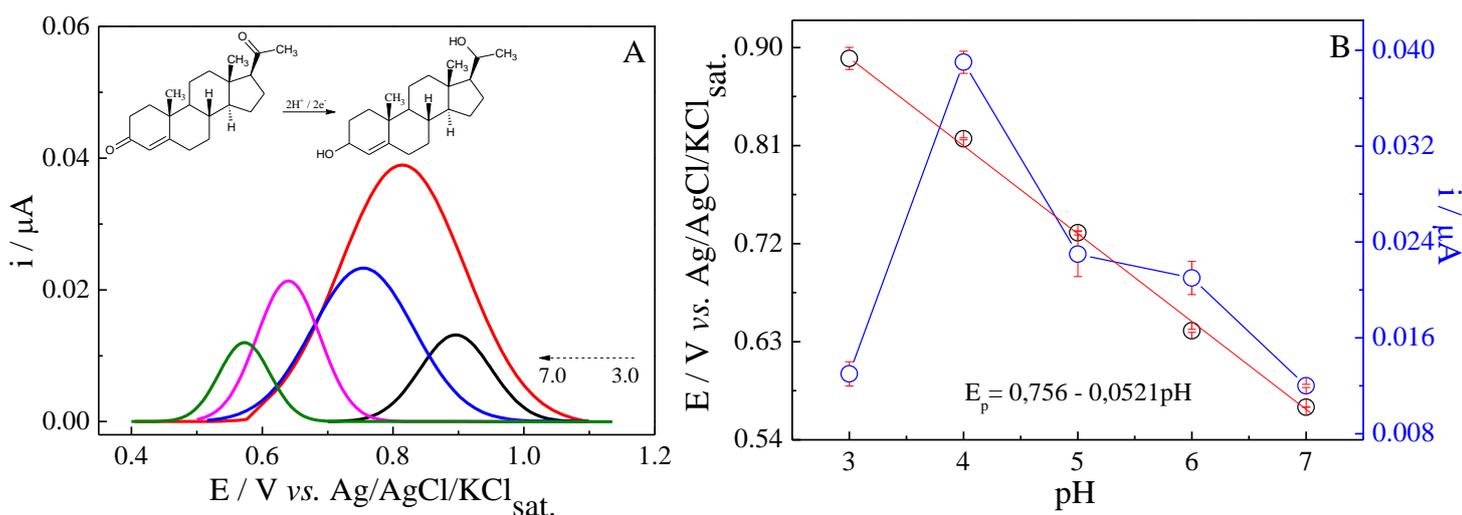
De acordo com o voltamograma mostrado na [Figura 12A](#), há um deslocamento de potencial de pico para valores menos positivos em função do aumento do pH. No entanto, destaca-se que em pH 7,0 ocorre um máximo de intensidade de corrente, e isto pode ser explicado pela melhor interação do analito no meio aquoso com as cargas neutras. Isto indica que há uma facilidade no processo de transferência de elétrons entre o E2 e o EIP, melhorando o comportamento para a sua detecção. Nesse sentido, a corrente de pico anódica é máxima em pH 7,0, sendo o pH ótimo para os estudos de determinação do E2. Observa-se uma relação linear entre o potencial de pico anódico e o pH, ([Figura 12B](#)) que pode ser representado pela [Eq.4](#).

$$E_p = 0,692 \text{ V} - 0,0521 \text{ pH} \quad (4)$$

Pela [Eq. 4](#), foi obtido o *slope* ( $dE_p/dpH$ ) igual a  $-0,0521$ , e este valor é próximo ao valor teórico da equação de Nernst ( $0,0592 \text{ V}$ ) ([ROSY et al., 2014](#)). Este dado confirma que as reações redox envolvidas no processo de oxidação do E2, apresentam o mesmo número de prótons e elétrons transferidos. Assim, o estudo de pH é importante para a confirmação do mecanismo de oxidação do E2 na superfície do eletrodo, como mostra o inset da [Figura 12A](#). A literatura reporta em outros estudos, o mesmo comportamento eletroquímico para a detecção do E2 em eletrodos a base de carbono, estando de acordo com este trabalho ([CHEN et al., 2018](#); [MORAES et al., 2015](#); [ÖZCAN; TOPÇUOĞULLARI, 2017](#); [WONG et al., 2019](#)).

O estudo da influência do pH para detecção de  $79,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  P4 foram realizados no meio de PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0) por VPD com os parâmetros otimizados mostrados na [Tabela 2](#). As [Figuras 13A e 13B](#) apresentam os voltamogramas de pulso diferencial e mecanismo da oxidação do analito (inset da Fig. 13A) e suas respectivas correlações de  $\Delta I_p$  vs. pH e  $\Delta E_p$  vs. pH.

Figura 13. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o estudo da influência do pH para detecção de P4 ( $79,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  usando EIP-2G ( $50\text{mG}/50\text{vV}$ ). Inset: mecanismo eletroquímico de oxidação da P4. (B)  $\Delta I_p$  vs. pH e  $\Delta E_p$  vs. pH.



Conforme a [Figura 13A](#), quando ocorre a variação do pH de 3,0 a 7,0 em meio de PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> ocorre um aumento nas respostas de oxidação da P4, e em pH 4,0 obtém a maior resposta de corrente. Após o pH 4,0 ocorre drasticamente uma queda das respostas de corrente de oxidação da P4. A eficiência no procedimento de transferência de elétrons entre P4 e o EIP pode ser destacado pela [Eq. 5 obtida por meio da](#) correlação linear obtida pela [Figura 13B](#).

$$E_p = 0,756 \text{ V} - 0,0521 \text{ pH} \quad (5)$$

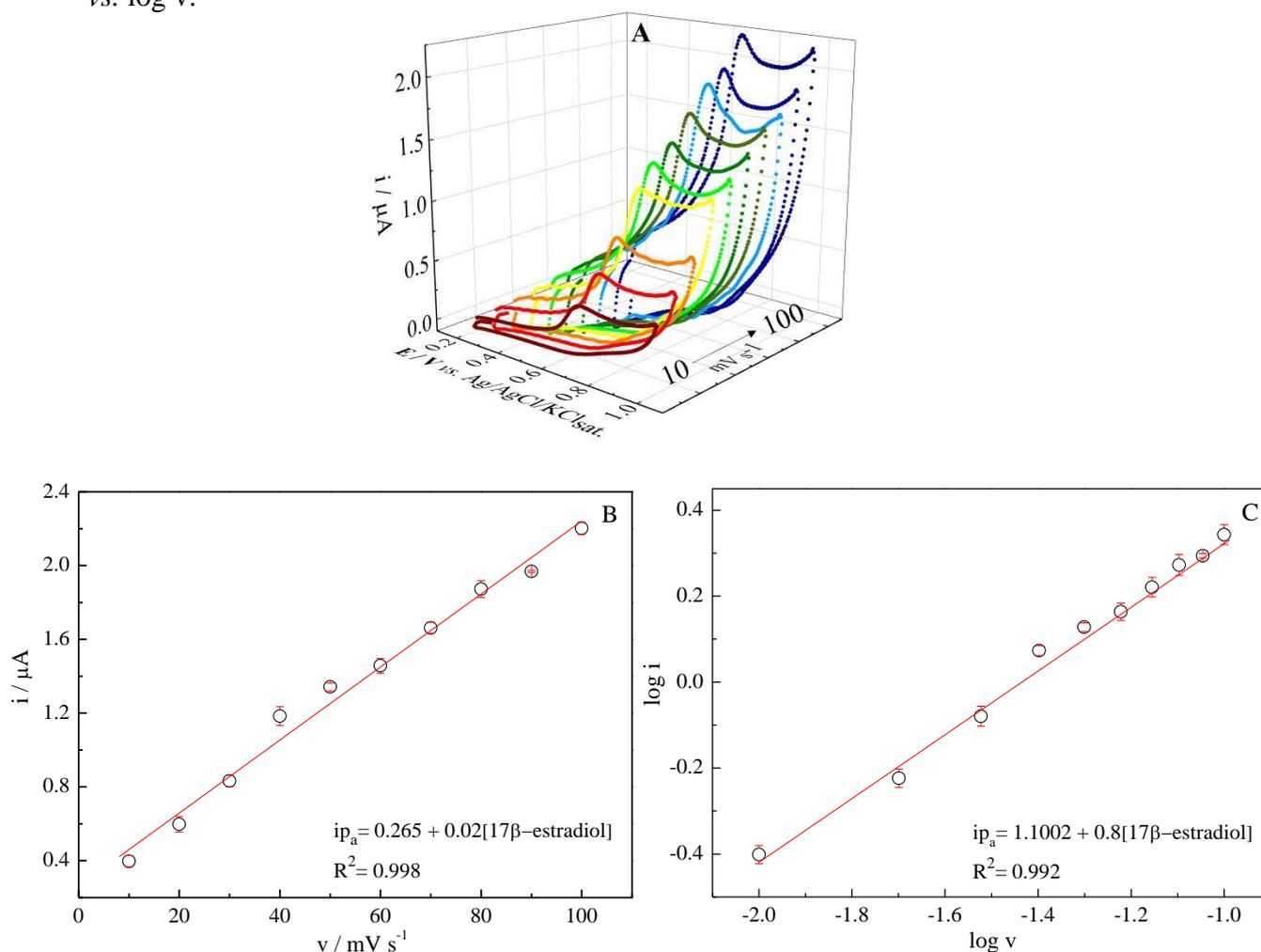
Analisando a [Eq. 5](#) obtida pela [Fig. 13B](#), destaca-se que pela inclinação da reta da relação  $\Delta E_p$  vs. pH é dada como -0,0521 V pH, que é próximo ao valor apresentado pela equação de Nernst, sugerindo que o processo de oxidação da P4 ocorre equivalentemente uma transferência de prótons e elétrons. Este resultado corrobora com outros trabalhos desenvolvidos ([ARVAND; ELYAN; ARDAKI, 2019](#); [DAS; SANGARANARAYANAN, 2018](#); [GRANDI; NAPOLITANO; CAGNACCI, 2016](#); [TARABORRELLI, 2015](#)), onde os mecanismos de oxidação seguem a mesma transferência de prótons e elétrons. Pelo inset mostrado na [Figura 13A](#), observa-se a transferência de 2 prótons e 2 elétrons referentes à oxidação da P4.

O valor de  $pK_a$  do E2 e P4 é 10,7 e 18,9, respectivamente, fazendo com que a extensão de carga diminua com o aumento do pH. Assim, em valores de pHs elevados, as correntes faradaicas e as correntes de pico de oxidação do E2 e P4 diminuem significativamente ([LEWIS; ARCHER, 1979](#); [MARQUES et al., 2015](#)). Ou seja, verifica-se que os pHs 7,0 e 4,0 são condições ótimas de detecção do E2 e P4, respectivamente. Em outras palavras, o pH do eletrólito suporte utilizado permitiu uma maior resposta de corrente para os analitos, uma vez que houve maior condutividade da solução, reduzindo a energia dissipada e originando melhores respostas faradaicas.

### 5.3.2 Efeito da velocidade de varredura na detecção do E2 e P4

O estudo do efeito da velocidade de varredura para a detecção de E2 foi realizado por VC no EIP como mostrado na [Fig. 14A](#). Utilizou-se uma solução de 0,137 mmol L<sup>-1</sup> E2 em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) com velocidade de varredura entre 10 - 100 mV s<sup>-1</sup>. Este estudo é importante para averiguar se os processos redox são controlados por difusão ou adsorção. Como mostram nos perfis voltamétricos, o E2 apresenta somente um pico de oxidação em potencial de ~0,69V, sendo característico de uma reação eletroquimicamente irreversível.

Figura 14. (A) Voltamogramas cíclicos da detecção de  $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$  E2 em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) com velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  –  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , (B)  $i$  vs.  $v$  e (C)  $\log i$  vs.  $\log v$ .



Houve um pequeno deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, sendo também típico de um comportamento eletroquimicamente irreversível (TERUI; FUGETSU; TANAKA, 2006). O perfil voltamétrico irreversível do E2 pode ser atribuído à oxidação do grupo  $\text{OH}$  presente no anel aromático da molécula, que resulta em um derivado correspondente de cetona (MURUGANANTHAN et al., 2007; NEZAMI et al., 2017; NGUNDI et al., 2003).

As Figuras 14B e 14C apresentam perfis lineares de  $i$  vs. velocidade de varredura (Eq. 6) e  $\log i$  vs.  $\log v$  (Eq. 7), respectivamente. Pela relação linear da Fig. 14C, obteve-se um valor de coeficiente angular de 0,80. De acordo com a teoria de Laviron (LAVIRON, 1972), os coeficientes angulares próximos a 1,0 caracterizam processos de oxidação controlados por adsorção. O valor reportado confirma a relação linear de  $i$  vs.  $v$  como foi averiguado na Fig. 14B. O cálculo de  $k^0$  para eletrooxidação de E2 é aplicado a partir da teoria de Laviron, que

determina sistemas irreversíveis com processos controlados por adsorção. Assim, foi calculado estimando que ocorre o mecanismo de oxidação via 1 elétron e 1 próton na reação de oxidação do E2.

$$i_{pa} = 0,265 + 0,02[E2] \quad (6)$$

$$\log i_{pa} = 1,1002 + 0,80 \log v[E2] \quad (7)$$

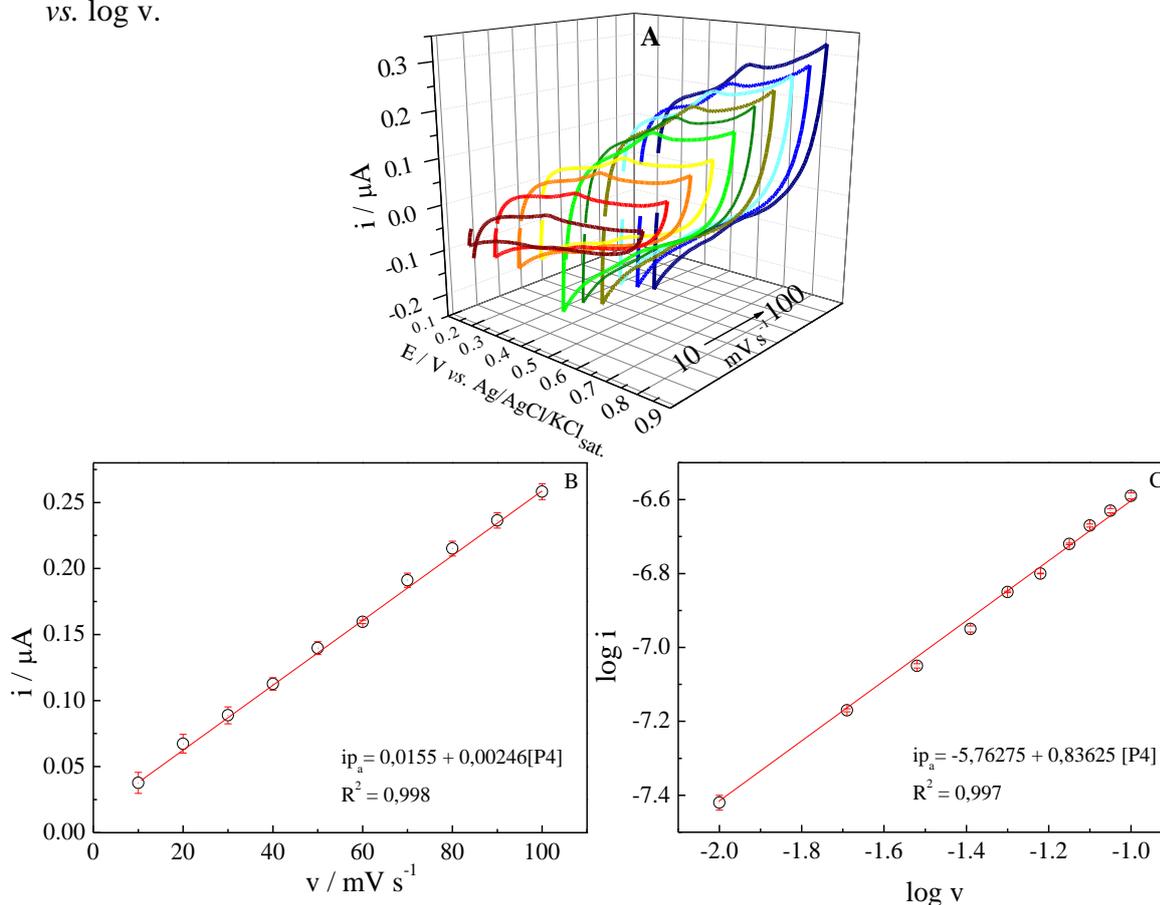
Para averiguar os parâmetros do processo de oxidação da P4 frente ao EIP, também foram realizados estudos de velocidades de varredura de 10 – 100  $\text{mV s}^{-1}$ , sendo analisada uma solução estoque de 0,16  $\text{mmol L}^{-1}$  P4 em PBS 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Nota-se pela [Figura 15A](#) que a oxidação da P4 ocorre  $\sim 0,54\text{V}$ , apresentando apenas 1 pico de oxidação, sendo considerado um processo de oxidação irreversível. Os gráficos de  $i$  vs.  $v$  ([Figura 15B](#)) e  $\log i$  vs.  $\log v$  ([Figura 15C](#)) explicitam que com o aumento da velocidade de varredura, as correntes de pico de oxidação da P4 aumentam gradativamente ( $\sim -26\%$  de aumento) em relação ao potencial de pico.

Pela relação  $\log i$  vs.  $\log v$ , são obtidas foram obtidas as equações de regressão linear descritas nas [Eq.7 e Eq.8](#).

$$i_{pa} = 0,01551 + 0,00246[P4] \quad (7)$$

$$\log i_{pa} = -5,76275 + 0,84 \log v[P4] \quad (8)$$

Figura 15. (A) Voltamogramas cíclicos da detecção de 0,16  $\text{mmol L}^{-1}$  P4 em solução PBS 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,0) com velocidade de varredura de 10  $\text{mV s}^{-1}$  – 100  $\text{mV s}^{-1}$ , (B)  $i$  vs.  $v$  e (C)  $\log i$  vs.  $\log v$ .

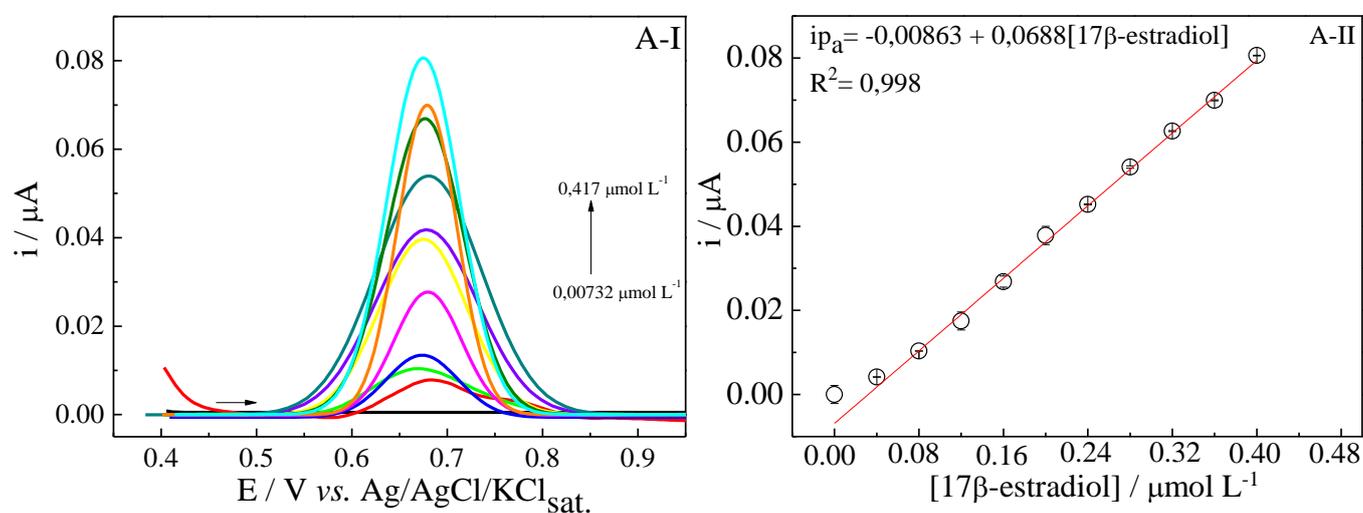


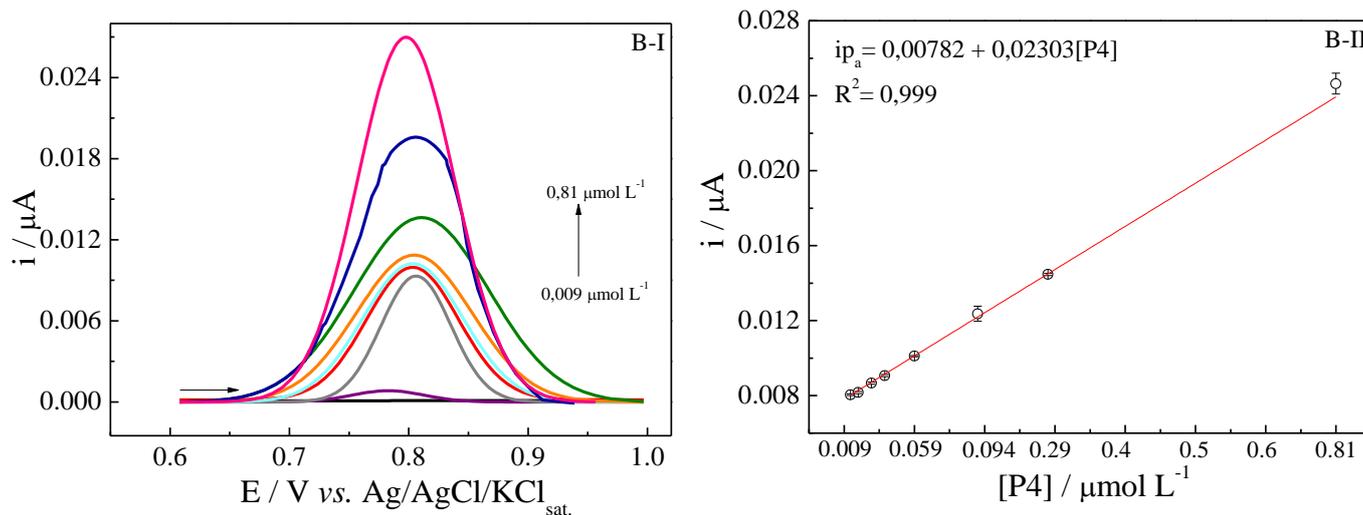
Observa-se o aumento de corrente de pico em função do aumento da velocidade para o processo de eletrooxidação da P4, bem como o valor do coeficiente angular ( $\sim 0,84$ ) obtido na Eq. 8 confirma que o processo de oxidação da P4 ocorre por adsorção. Ao aplicar a teoria de Laviron que estima a quantidade de elétrons e prótons envolvidos na reação, verifica-se que ocorre um mecanismo de oxidação da P4 com 2 elétrons e 2 prótons. Tal mecanismo pode ser explicado pela formação de dímeros, decorrente de etapas radicalares das reações intermediárias de oxidação da P4, a qual oxidação na posição C6 resulta na formação de radical catiônico que em presença de meio aquoso forma-se ao final um grupo  $\text{OH}$  no carbono C6 (ARVAND; HEMMATI, 2017a; AKSHAYA, K. B. et al., 2019; SHAMSIPUR et al., 2017).

#### 5.4 Aplicação do EIP e EIP-CP6L<sub>SE</sub> para a detecção e quantificação de E2 e P4

A partir da otimização dos parâmetros da VPD, foram realizadas as construções das curvas analíticas para E2 e P4 no EIP. Diferentes alíquotas das soluções padrões de E2 e P4 foram adicionadas aos eletrólitos suportes com o pH otimizado, e as medidas foram realizadas em triplicata. Os voltamogramas de pulso diferencial e as curvas analíticas para a detecção de E2 e P4 quando aplicadas em EIP são apresentados nas Figuras 16A-I a 16B-II, respectivamente.

Figura 16. Voltamogramas de pulso diferencial aplicados no EIP para a detecção de (A-I) E2 com variação de concentração entre 0,00732 a 0,417  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 7,0) e (B-I) P4 com variação de concentração entre 0,009 a 0,812  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 4,0). Correlação linear de  $i_{pa}$  vs. concentração para obtenção da curva analítica da detecção de (A-II) E2 e (B-II) P4.





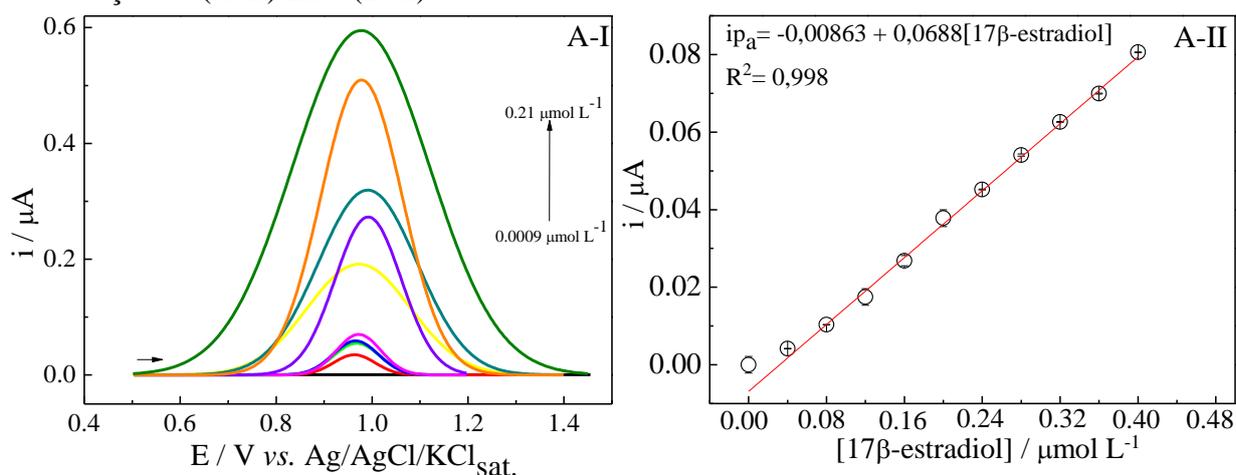
A detecção eletroquímica de E2 frente ao EIP (Figura 16A-I) apresenta picos de oxidação com correntes máximas próximas a  $+0,08 \mu\text{A}$  com potencial de pico de  $\sim +0,67 \text{ V}$ . Para a P4 (Figura 16B-II), destaca-se que os picos de oxidação são observados em  $\sim 0,8 \text{ V}$ , atingindo correntes de pico anódicas em  $\sim 0,028 \mu\text{A}$ . Com esses resultados, pode-se ressaltar que há maior sensibilidade na detecção da em relação ao E2 quando aplicado o EIP, sendo nítido pela diferença de intensidades máximas de correntes de pico ( $\sim 35\%$  maior as correntes de pico). As faixas lineares de concentrações utilizadas neste estudo apresentam correlações lineares dos picos anódicos com valores de  $R^2 = 0,998$  (DPR= 2,429%) para E2 e  $R^2 = 0,999$  (DPR= 5,321%) para P4. As equações obtidas a partir das regressões lineares para o E2 e P4 frente ao EIP são mostradas nas Eq. 9 e 10.

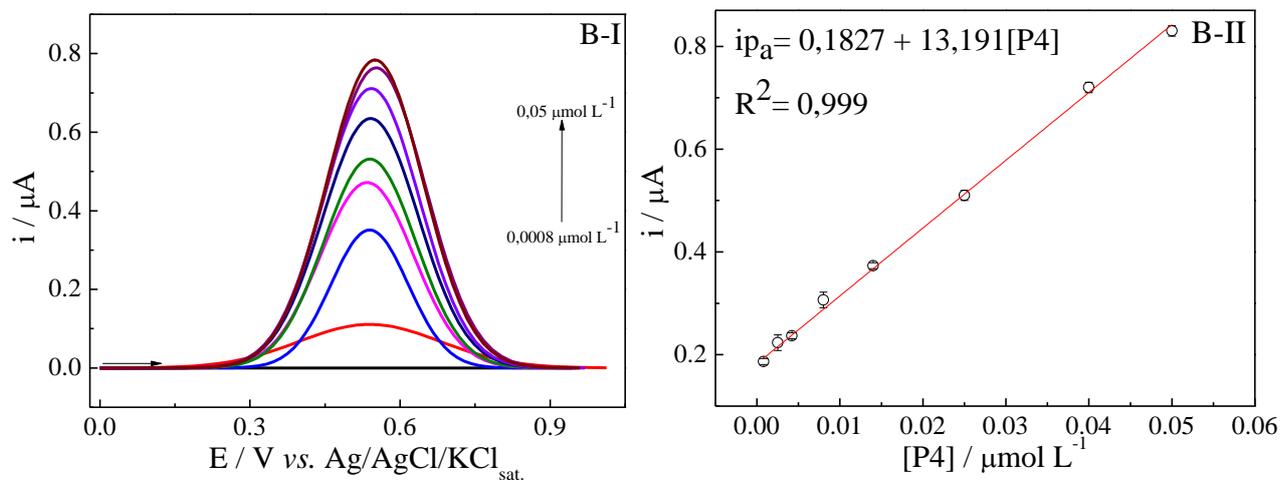
$$i_{pa}(\mu\text{A}) = 0,0086 - 0,00688 [\text{E2}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (9)$$

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = 0,0078 + 0,0230 [\text{P4}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (10)$$

Com a modificação da superfície do EIP com carbono Printex 6L + SE, foram construídas as curvas analíticas (Figuras 17A-II e 17B-II) para E2 e P4 no eletrólito suporte com pH otimizado.

Figura 17. Voltamogramas de pulso diferencial aplicados no EIP-CP6L<sub>SE</sub> para a detecção de (A-I) E2 com variação de concentração entre  $0,0009$  a  $0,21 \mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e (B-I) P4 com variação de concentração entre  $0,0008$  a  $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,0). Correlação linear de  $i_{pa}$  vs. concentração para obtenção da curva analítica da detecção de (A-II) E2 e (B-II) P4.





Analisando as Figuras 17A-I e 17B-I nota-se nitidamente que as correntes de pico anódicas aumentaram em aproximadamente 8 vezes para detecção de E2 e 35 vezes para detecção de P4. Observa-se também, que ao modificar a superfície do EIP, as detecções analíticas apresentaram deslocamentos de potenciais de picos, sendo para E2  $\sim +0,97\text{V}$  (região mais positiva) e P4 para  $\sim +0,54\text{V}$ . Em estudos da detecção do E2 e P4 ao que corresponde sobre sensibilidade analítica e/ou mudança do potencial de oxidação do analito, é importante mencionar que a mudança de potencial de oxidação deve-se possivelmente ao sobrepotencial do SE, ou seja, o potencial catódico para a resposta de corrente é afetado por um processo de difusão controlada. Por outro lado, mesmo com a influência do sobrepotencial do SE, o processo de transferência de elétrons na superfície do EIP-CP6L<sub>SE</sub> é considerável, uma vez que há um aumento das respostas de correntes de oxidação dos analitos nesses potenciais de pico quando comparado ao EIP, mesmo o sistema sendo limitado ao transporte de massa. Ademais, relatos da literatura descrevem que a modificação da superfície do eletrodo com materiais carbonáceos resulta em uma espécie de filme condutor altamente poroso, que melhora significativamente o desempenho eletrocatalítico do sensor (ARAÚJO et al., 2020; CINTI et al., 2017; DAS; SANGARANARAYANAN, 2018; AKSHAYA, K. B. et al., 2019).

Essa modificação, promove um aumento de sítios ativos no eletrodo, fazendo com que o processo cinético envolvido na transferência de elétrons para a oxidação do E2 e P4 seja elevado, além de ocorrer baixa resistência à transferência eletrônica entre as espécies e o EIP-CP6L<sub>SE</sub>. Destaca-se que em concentrações superiores a  $0,021 \mu\text{mol L}^{-1}$  de E2 quando utilizado o EIP-CP6L<sub>SE</sub>, o perfil voltamétrico torna-se largo e o pico de corrente alcança um patamar

elevado. Provavelmente pode ser atribuído ao excesso de analito na superfície do eletrodo, assim como também pela diminuição dos sítios ativos durante a transferência de elétrons nesta superfície.

Para avaliar os parâmetros de confiabilidade analítica dos analitos quando aplicado o EIP e EIP-CP6L<sub>SE</sub>, foram calculados os valores de LOD e LOQ, usando três vezes o valor do desvio padrão do branco (3S<sub>b</sub>) e dez vezes o desvio padrão do branco (10S<sub>b</sub>), respectivamente, divididos pela inclinação angular (slope) das retas obtidas das curvas analíticas. Onde: S<sub>b</sub> é o desvio padrão do valor médio para dez repetições independentes da solução do eletrólito (PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>) (SKOOG et al., 2014). A Tabela 5 mostra os valores de LOD, LOQ, intervalos lineares de E2 e P4 e desvio padrão relativo (DPR) obtidos.

Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos pelas determinações individuais de E2 e P4 em EIP e EIP-CP6L<sub>SE</sub>.

<b>Analitos</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>DPR (%)*</b>
<b>EIP</b>				
E2	0,00732 – 0,417	0,177	0,586	2,429
P4	0,009 – 0,812	0,00582	0,0194	5,321
<b>EIP-CP6L<sub>SE</sub></b>				
E2	0,0009 – 0,21	0,0065	0,0216	0,427
P4	0,0008 – 0,05	0,00075	0,00257	0,369

\* DPR= [(desvio padrão) / (média)] x 100

Os valores de LOD obtidos para E2 e P4 apresentaram um aumento, que pode ser explicado pelo acréscimo de sensibilidade frente à aplicação do EIP-CP6L<sub>SE</sub>, indicando que este eletrodo apresenta maior resposta eletroativa para os analitos, se comparado com o EIP. Quando comparados de forma genérica com outros trabalhos na literatura (Tabela 6), verifica-se que a modificação do EIP promove aumento na sensibilidade analítica no processo de detecção do E2 e P4. Pode-se afirmar também que os valores de LOD obtidos neste trabalho são suficientes para realizar a análise de E2 e P4 em diferentes tipos de amostras.

Tabela 6. Parâmetros obtidos da curva analítica das análises de E2 e P4 e comparação com estudos previamente publicados.

<b>Eletrodos</b>	<b>Analito</b>	<b>Técnica</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Referência</b>
CuPc-P6LC-Nafion/SPE <sub>F</sub>	E2	VPD	0,08–7,3	0,005	(WONG et al., 2019)
GC/RGO/CuTthP	E2	VPD	0,10–1,00	0,0053	(MORAES et al., 2015)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -MIP/SPCE	E2	VOQ	0,05–10	0,020	(LAHCEN et al., 2017)
AuNP/MWCNT/ECV	E2	VL	1,00–20	0,07	(MASIKINI et al., 2019)
SPE	E2	VPD	0,50–10	0,37	(RAYMUNDO-PEREIRA et al., 2019)
Cu-BTC/CPE	E2	VPD	0,003–0,75	0,0011	(JI et al., 2016)
Sn/ECV	P4	VPD	5–80	0,12	(DAS; SANGARANARAYANAN, 2018)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @GQD/f-MWCNTs/EVC	P4	VPD	0,01–3,00	0,002	(ARVAND; HEMMATI, 2017b)
GO-IMZ/ECV	P4	VOQ	0,22–14,0	0,064	(GEVAERD et al., 2018)
EIP-2G (50mG/50vV)	E2	VPD	0,00732–0,417	0,177	<i>Este trabalho</i>
EIP-CP6L <sub>SE</sub>	E2	VPD	0,0009–0,21	0,0065	<i>Este trabalho</i>
EIP-2G (50mG/50vV)	P4	VPD	0,009 – 0,812	0,00582	<i>Este trabalho</i>
EIP-CP6L <sub>SE</sub>	P4	VPD	0,0008 – 0,05	0,00075	<i>Este trabalho</i>

### 5.5 Estudo de recuperação, seletividade e validação do método

Com o objetivo de estudar a aplicabilidade do método proposto, o estudo de adição-recuperação padrão do E2 e P4 (Tabela 7) foi realizado em quatro amostras comerciais de água mineral, saliva artificial, e urina sintética. As Figuras 1 e 2 do Apêndice B, mostram os voltamogramas de pulso diferencial das adições de E2 e P4, respectivamente, em diferentes concentrações.

Tabela 7. Detecção e recuperação do E2 e P4 em amostras reais utilizando o EIP-CP6L<sub>SE</sub>.

Amostras	Adicionado / μmol L <sup>-1</sup> (E2)	Encontrado / μmol L <sup>-1</sup> (E2)	*Recuperação / % (E2)	DPR / % (E2)	Adicionado / μmol L <sup>-1</sup> (P4)	Encontrado / μmol L <sup>-1</sup> (P4)	*Recuperação / % (P4)	DPR / % (P4)
<b>Saliva artificial</b>	0,051	0,0487 (±0,2)	97,42	1,87	0,0042	0,00419 (±0.01)	99,76	1,34
	0,090	0,0919 (±0,2)	102,10	1,45	0,0090	0,00899 (±0.1)	99,88	1,85
<b>Água mineral</b>	<sup>a</sup> 0,051	0,0490 (±0,1)	98,0	1,68	<sup>a</sup> 0,0042	0,00418 (±0.1)	99,52	1,92
	<sup>a</sup> 0,090	0,0895 (±0,1)	99,44	1,96	<sup>a</sup> 0,0090	0,0101 (±0.2)	110,01	1,94
	<sup>b</sup> 0,051	0,0470 (±0,4)	92,15	4,78	<sup>b</sup> 0,0042	0,00320 (±0.4)	99,10	1,92
	<sup>b</sup> 0,090	0,0910 (±0,1)	101,11	1,92	<sup>b</sup> 0,0090	0,00895 (±0.1)	99,44	1,68
	<sup>c</sup> 0,051	0,0505 (±0,2)	99,01	1,86	<sup>c</sup> 0,0042	0,00416 (±0.3)	99,04	1,92
	<sup>c</sup> 0,090	0,0915 (±0,1)	101,67	1,68	<sup>c</sup> 0,0090	0,00896 (±0.2)	99,55	1,44
	<sup>d</sup> 0,051	0,0480 (±0,2)	94,12	1,92	<sup>d</sup> 0,0042	0,00418 (±0.1)	99,52	1,97
	<sup>d</sup> 0,090	0,0887 (±0,3)	98,55	3,56	<sup>d</sup> 0,0090	0,00899 (±0.01)	99,88	1,56
<b>Urina sintética</b>	0,051	0,0501 (±0,1)	98,23	1,69	0,0042	0,00419 (±0.1)	99,87	1,22
	0,090	0,0912 (±0,1)	101,33	1,94	0,0090	0,00897 (±0.1)	99,70	1,98

n= 4; a,b,c,d: diferentes amostras de água mineral

\*Porcentagem de recuperação= [encontrado / adicionado] ×100

Este estudo foi desenvolvido com base nas curvas analíticas do E2 e P4, e os experimentos foram realizados em quadruplicata ( $n=4$ ) para cada concentração adicionada. Durante os experimentos, duas concentrações de E2 ( $0,051 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e P4 ( $0,0042 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,009 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram adicionadas às amostras, e sucessivas adições de  $0,15$  e  $0,20 \mu\text{mol L}^{-1}$  também foram adicionadas a fim de garantir a precisão do método. De acordo com os resultados obtidos, a recuperação foi de aproximadamente 100% para todas as amostras estudadas, e os valores de DPR calculados foram entre 1,22 e 4,78%, apresentando boa precisão uma vez que os valores das concentrações dos analitos ficaram próximas aos valores de concentrações adicionadas nas amostras. Isto indica a ausência de efeitos de matriz, não interferindo na resposta do analito (MORAES et al., 2015).

Os estudos de reprodutibilidade e repetibilidade para determinação de E2 ( $0,090 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e P4 ( $0,0090 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no EIP-CP6L<sub>SE</sub> são mostrados nas Figuras 18 e 19. Os perfis da VPD mostram os experimentos realizados no intervalo intra-day (Figuras 18A e 19A) e inter-day (Figuras 18B e 19B).

Figura 18. Voltamogramas de pulso diferencial em EIP-CP6L<sub>SE</sub> obtidos durante o estudo de repetibilidade (A) intra-day e reprodutibilidade (B) inter-day para determinação de  $0,09 \mu\text{mol L}^{-1}$  E2.

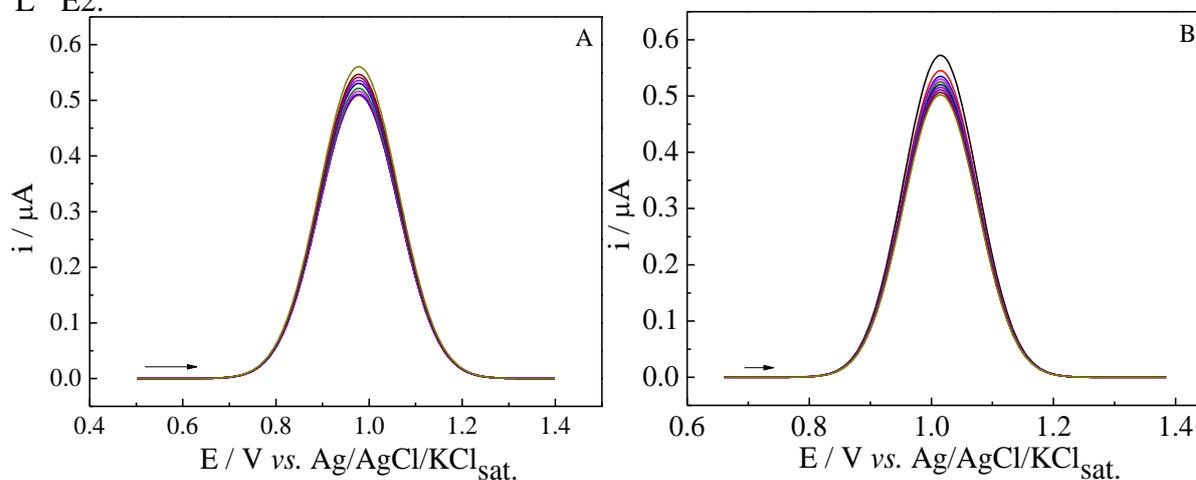
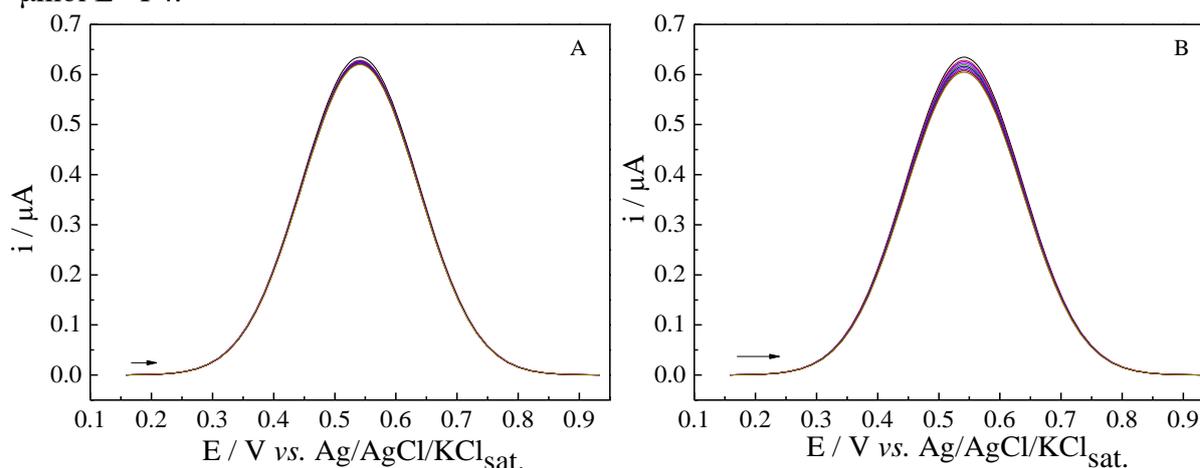


Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial em EIP-CP6L<sub>SE</sub> obtidos durante estudo de repetibilidade (A) intra-day e reprodutibilidade (B) inter-day para determinação de  $0,009 \mu\text{mol L}^{-1}$  P4.



Para os experimentos de repetibilidade, o estudo foi realizado em 10 replicatas (n= 10) usando apenas um eletrodo, e os valores de DPR foram 1,905% e 0,683% para E2 e P4, respectivamente. Nos experimentos de reprodutibilidade, foram construídos 10 eletrodos com os mesmos parâmetros e configuração, e o estudo foi realizado em diferentes dias. Para este caso, os valores de DPR obtidos foram 2,016% para E2 e 1,563% para P4. Assim, observa-se que houve elevada repetibilidade e reprodutibilidade na fabricação dos eletrodos pelo método proposto para aplicação na determinação dos analitos.

O estudo de seletividade (n=5) foi realizado para determinação do E2 e P4 na presença de outros compostos tais como, AA, CAF, LOS e EE2. A [Tabela 8](#) apresenta os resultados experimentais para a determinação dos analitos nos compostos interferentes. A proporção estudada de analito:interferente foi 1:2 e houve uma pequena variação de corrente de pico anódica, apresentando um erro relativo entre 3,0% a 9,6%, na detecção do E2, e 0,356% a 7,81% para P4. Este estudo está de acordo com trabalhos reportados na literatura, uma vez que pelo método proposto e o tipo de eletrodo, o estudo de seletividade é viável durante a determinação de E2 e P4 em diversos tipos de interferentes ([GUPTA; GOYAL; SHIM, 2015](#); [MORENO et al., 2010](#); [VARODI et al., 2020](#); [ARVAND; ELYAN; ARDAKI, 2019](#); [DAS; SANGARANARAYANAN, 2018](#)).

Tabela 8. Estudo do efeito dos interferentes na determinação de E2 e P4 frente a EIP-CP6L<sub>SE</sub>.

Interferentes	$i_{\text{médiaE2}}$	Erro relativo	DPR	$i_{\text{médiaP4}}$	Erro relativo	DPR
		(%)*			(%)*	
		(E2)			(P4)	
<b>Ácido ascórbico (AA)</b>	0,302±0,01	+ 9,6	4,425	0,4929±0.05	+7,81	3,256
<b>Cafeína (CAF)</b>	0,299±0,008	+ 8,7	2,732	0,5088±0.02	+4,44	1,569
<b>Losartana potássica (LOS)</b>	0,263±0,007	+ 3,8	2,913	0,4999±0.02	+6,30	1,637
<b>17<math>\alpha</math>-Ethinilestradiol (EE2)</b>	0,265±0,006	+ 3,0	2,349	0,5333±0.002	+0,356	1,354

\*n=5

Para o estudo de validação (n=5), utilizou-se a Espectroscopia de UV-Vis como método comparativo ao método proposto (VPD) ([Tabela 9](#)).

Tabela 9. Determinação do E2 e P4 em amostra de água mineral frente ao EIP-CP6L<sub>SE</sub>.

E2						
Amostra	Adicionado* ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Método proposto	Método comparativo	% recuperação**	Erro relativo (%)***	Teste- <i>t</i> calculado
		Encontrado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Encontrado / $\mu\text{mol L}^{-1}$			
Água mineral	10	9,916±0,03	9,78±0,03	+99,16	+1,4	0,33
	60	60,1±0,03	61,24±0,08	+100,16	+1,9	1,306

P4						
Amostra	Adicionado* ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Método proposto	Método comparativo	% recuperação**	Erro relativo (%)***	Teste- <i>t</i> calculado
		Encontrado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Encontrado / $\mu\text{mol L}^{-1}$			
Água mineral	10	10,02± 0.03	10,9 ± 0.02	+100,02	+8,07	0,297
	60	60,01± 0.01	59,7 ± 0.09	+100,01	+0,38	1,313

\*n=5;

\*\*Porcentagem de recuperação =[encontrado/adicionado]x100

\*\*\*Erro relativo= [(método proposto – método comparativo) / método comparativo]x100

Verifica-se pela [Tabela 9](#) que as concentrações encontradas pelo método proposto são aproximadamente iguais àsquelas do comparativo. Portanto, obteve-se um erro relativo entre +1,4% e 1,9% para as duas concentrações estudadas (10 e 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), respectivamente e, a porcentagem de recuperação do analito foi entre 99,16 e 100,16% para E2. Para o estudo com P4, obtiveram-se erros relativos de +8,07% e +0,38% para ambas as concentrações adicionadas (10 e 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), assim como também percentual de recuperação de +100,02% e +100,01%

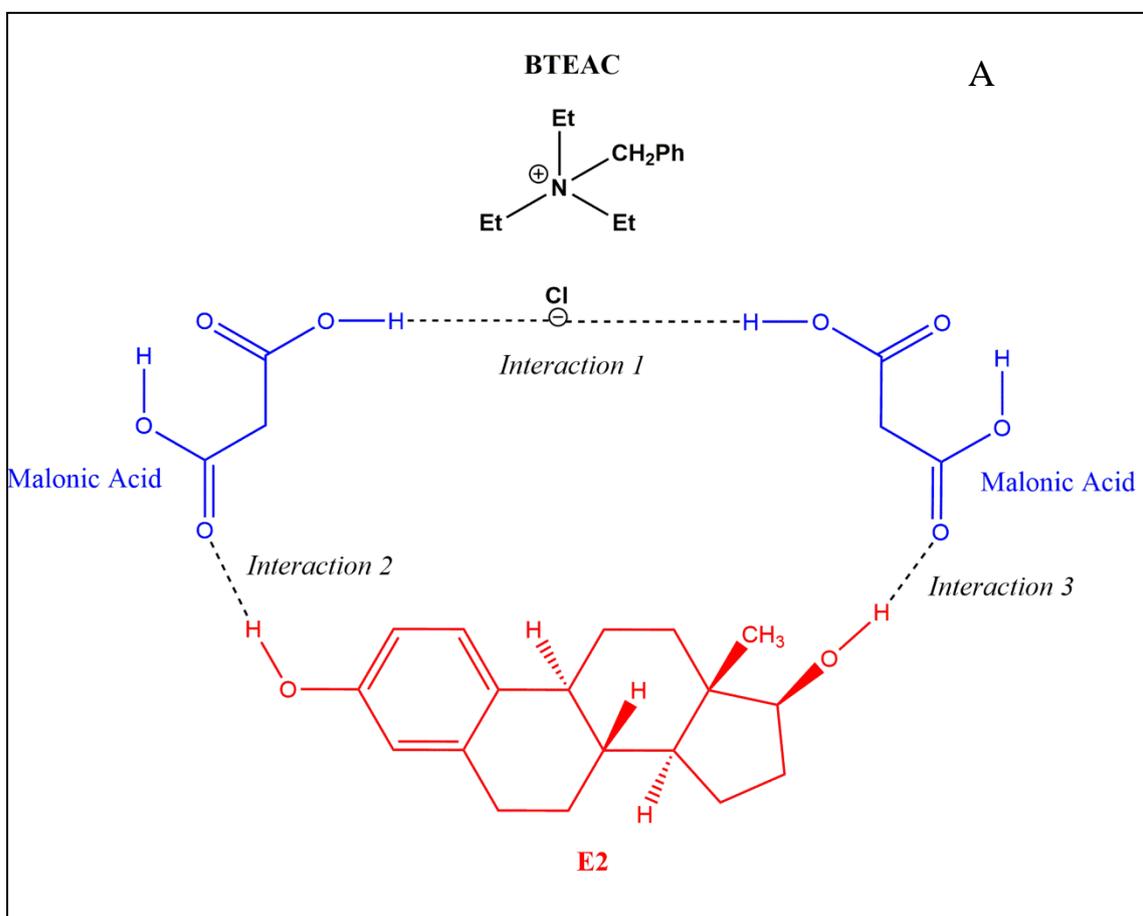
Posteriormente, foi aplicado o teste *t* de Student, a um nível com 95% de confiança. Este teste permite averiguar se o método desenvolvido apresenta resultados próximos ao método comparativo, sendo este escolhido para validação uma vez que apresenta algumas vantagens em relação a rapidez e confiabilidade nos resultados, permitindo analisar E2 e P4 em amostra real, sem precisar de uma etapa mais complexa durante o preparo das amostras. Logo, verifica-se que não houve diferença significativa entre os métodos UV-Vis e VPD, indicando que o sensor EIP-CP6L<sub>SE</sub> desenvolvido neste trabalho pode ser utilizado para a determinação de E2 e P4 em água mineral.

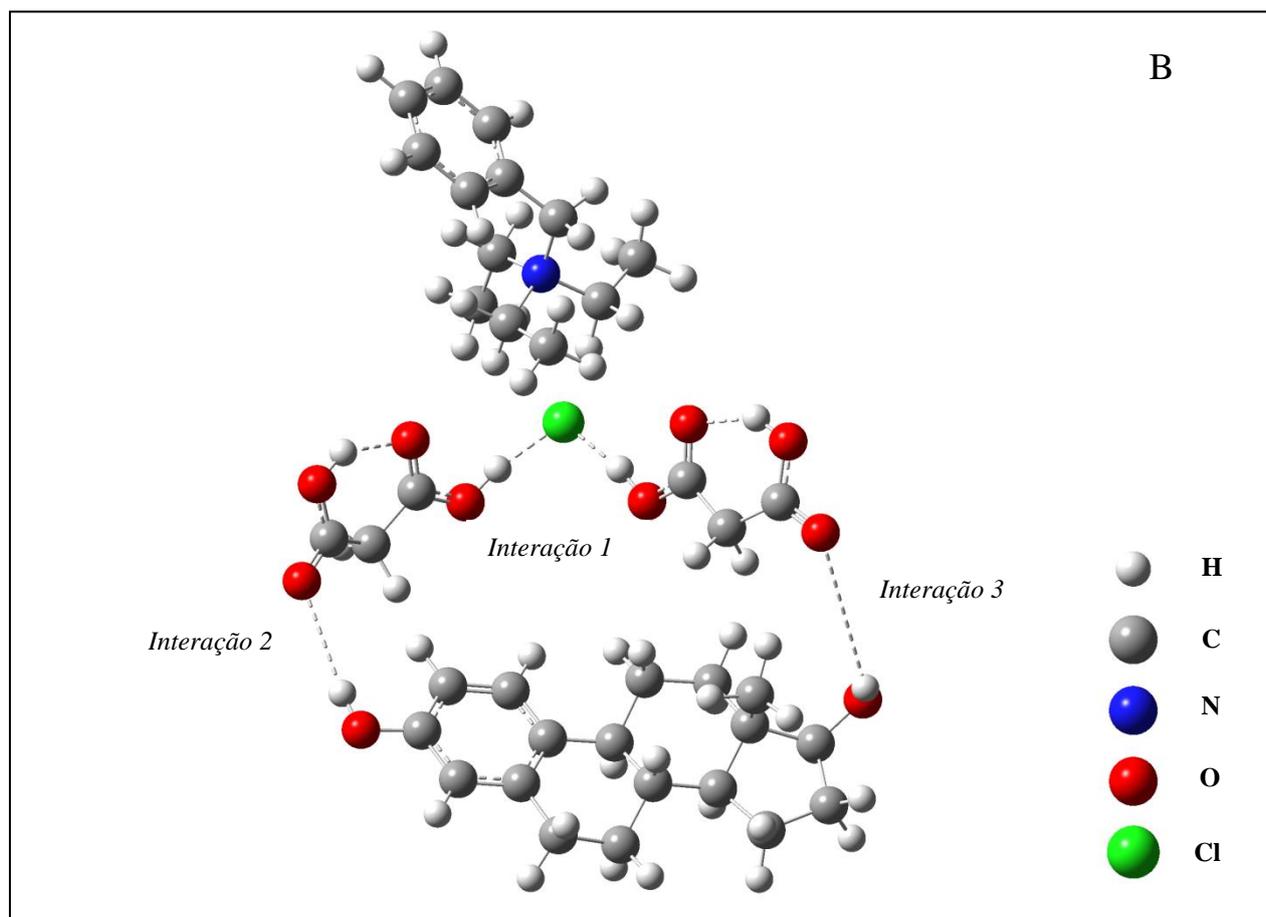
## 5.6 Proposta de mecanismo de oxidação do E2 e P4

Em se tratando da modificação do EIP, o SE tem papel importante para a detecção eletroquímica do E2 e P4, uma vez que a deposição da mistura de carbono Printex 6L+SE no eletrodo não modificado tornou o eletrodo com uma superfície mais uniformemente rugosa. Assim, ocorre maior disponibilidade durante o processo de transferência de elétrons na superfície do EIP-CP6L<sub>SE</sub>, o que conseqüentemente aumenta a sua sensibilidade. A literatura reporta que o efeito melhorado do SE no processo é uma consequência das ligações de H formadas no sistema (BRETT, 2018; NKUKU; LESUER, 2007; PRATHISH; CARVALHO; BRETT, 2016). Portanto, o mecanismo proposto favorece as interações mais fortes (O-H...Cl e O-H...O) entre BTEAC:MA (1:2) e às espécies E2 e P4.

As Figuras 20A e 20B mostram a proposta de mecanismo para detecção de E2 pela interação com SE em representação nos modos bidimensional e tridimensional, respectivamente.

Figura 20. Mecanismo proposto para detecção do E2 pela interação entre BTEAC:AM (1:2, razão molar) e analito. (A) Modo bidimensional e (B) tridimensional.

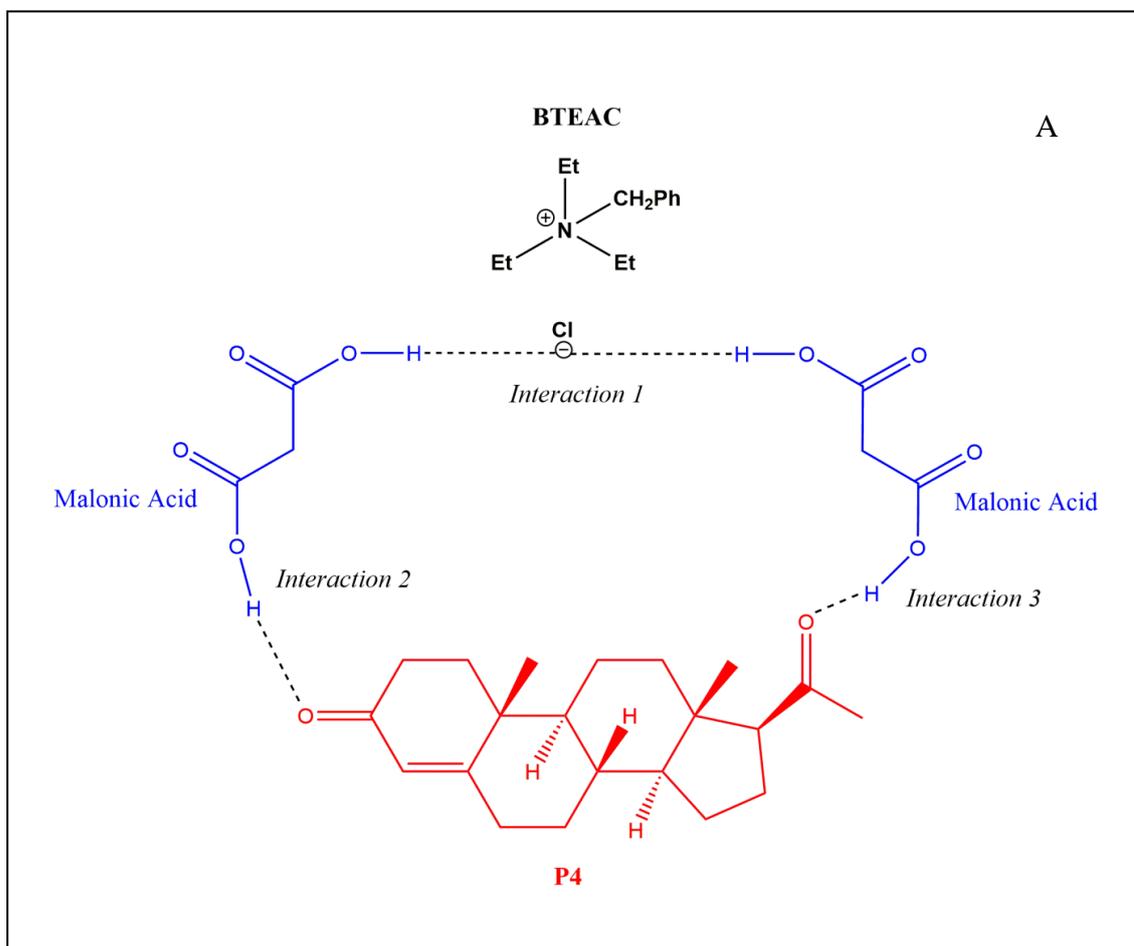


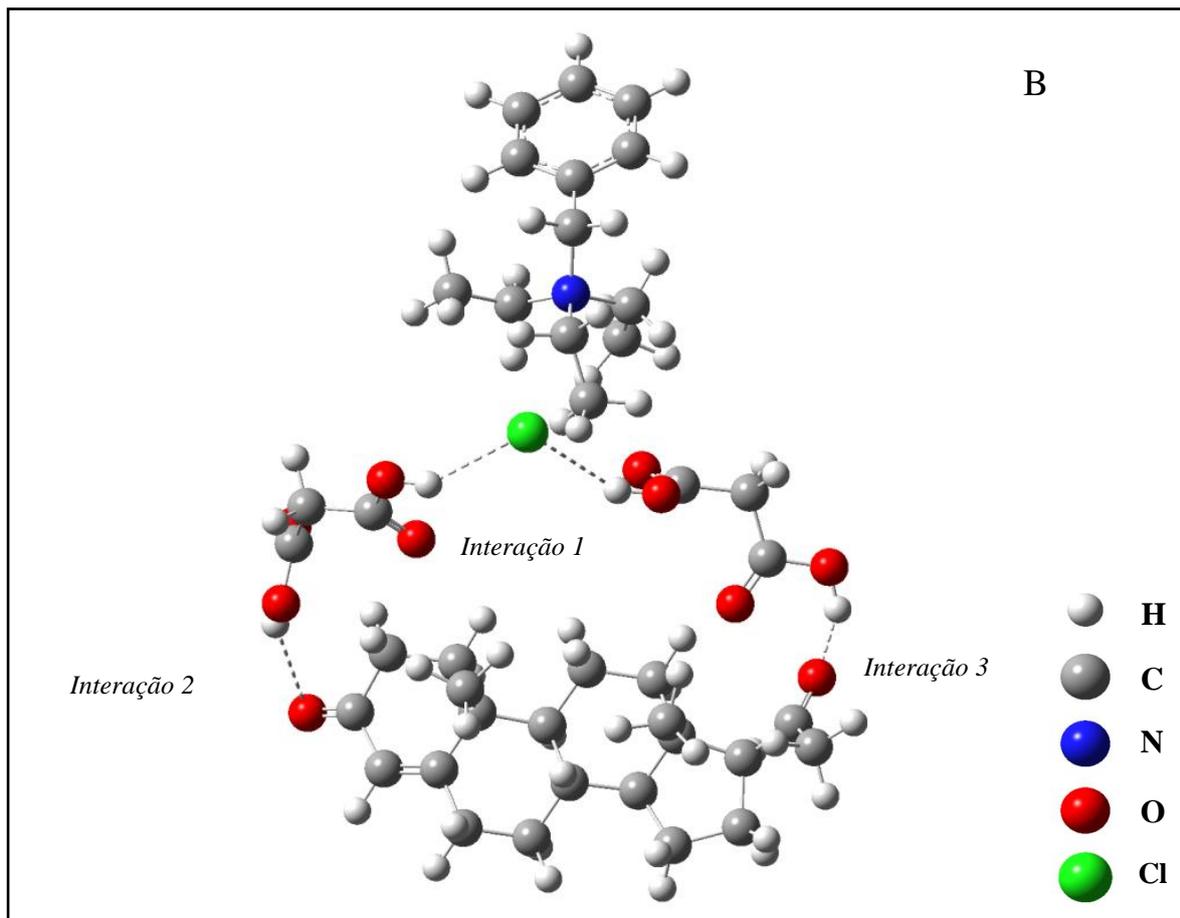


Conforme mostram as [Figuras 20A e 20B](#), a interação 1 ocorre entre o Cl<sup>-</sup> do CBTEA com o grupo O-H das duas moléculas de AM. A interação 2 ocorre entre o átomo de O do grupo C=O do AM (aceitador de ligação de H) e o grupo fenol do E2 (doador de ligação de H). A interação 3 é formada pelo átomo de O do grupo C=O do AM (aceitador de ligação de H) e o grupo C-OH (doador de ligação de H). Nesse contexto, provavelmente as interações 2 e 3 possibilitam o aumento da sensibilidade para a detecção do E2.

A proposta de mecanismo para detecção da P4 é apresentada nas [Figuras 21A e 21B](#). Nota-se que a interação 1 ocorre entre o Cl<sup>-</sup> do CBTEA com o grupo O-H das duas moléculas de AM. As interações 2 e 3 interações são do tipo OH- O e ocorrem entre o grupo -OH do AM com as funções cetônicas da P4 de acordo com a representação nos modos bidimensional e tridimensional apresentadas. Assim, provavelmente essas interações possibilitaram o aumento da sensibilidade de detecção da P4.

Figura 21. Mecanismo proposto para detecção do P4 pela interação entre CBTEA:AM (1:2, razão molar) e analito. (A) Modo bidimensional e (B) tridimensional.





Ademais, ressalta-se que o uso do EIP-CP6L<sub>SE</sub> proposto neste trabalho, é promissor não somente para a aplicação na determinação do E2 e P4, mas também para a determinação de outros estrogênios e disruptores endócrinos, uma vez que há facilidade na preparação do eletrodo e estabilidade analítica no que diz respeito à resposta eletroquímica.

## 6 CONCLUSÕES

Os sensores eletroquímicos desenvolvidos neste trabalho mostraram elevada eficiência eletroanalítica, seletividade, e estabilidade eletroquímica, além de ser produzido com materiais de baixo custo. Destaca-se que o estudo intra-day e inter-day, permitiu verificar que o EIP apresenta eficiência na reprodutibilidade e repetibilidade das respostas de corrente. O eletrodo modificado com carbono Printex 6L + SE favoreceu o aumento da sensibilidade para detecção do E2 e P4 em amostras de águas minerais, urina sintética e saliva artificial, tendo ~100% de recuperação dos analitos. Estes resultados foram possíveis devido à estabilidade da microcamada de Printex 6L + SE depositada na superfície do EIP, além das fortes interações intramoleculares entre os analitos e SE. Os resultados de seletividade mostraram que os compostos adicionados à solução do E2 e P4 não interferem na sua resposta eletroquímica. Ademais, o estudo de validação do método foi eficiente, uma vez que as concentrações de E2 e P4 determinadas pelo método comparativo foram aproximadamente iguais ao método proposto, apresentando baixos valores de DPR, ou seja, com elevada precisão. A construção do EIP-CP6L<sub>SE</sub> é viável e permite a determinação de diversas espécies, apresentando resultados com confiabilidade analítica.

## 7 REFERÊNCIAS

ADEEL, M.; YANG, Y. S.; WANG, Y. Y.; SONG, X. M.; AHMAD, M. A.; ROGERS, H. Uptake and transformation of steroid estrogens as emerging contaminants influence plant development. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1487–1497, 2018.

AFLATOONIAN, M. R.; TAJIK, S.; EKRAMI-KAKHKI, M.; AFLATOONIAN, B.; BEITOLLAHI, H. A nano-sensor based on screen printed electrode (SPE) for electrochemical detection of vitamin B9. **Eurasian Chemical Communications**, v.2, p. 609–618, 2020.

AFSHARI, M.; DINARI, M.; MOMENI, M. M. The graphitic carbon nitride/polyaniline/silver nanocomposites as a potential electrocatalyst for hydrazine detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, n. Junho, p. 9–16, 2019.

AKSHAYA, K. B.; BHAT, V. S.; VARGHESE, A.; GEORGE, L.; HEGDE, G. Non-Enzymatic Electrochemical Determination of Progesterone Using Carbon Nanospheres from Onion Peels Coated on Carbon Fiber Paper. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 13, p. B1097–B1106, 2019.

ALONSO-LOMILLO, M. A.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; SALDAÑA-BOTÍN, A.; ARCOS-MARTÍNEZ, J. Determination of ascorbic acid in serum samples by screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. **Talanta**, v. 174, n. Maio, p. 733–737, 2017.

ARAÚJO, D. A. G.; CAMARGO, J. R.; PRADELA-FILHO, L. A.; LIMA, A. P.; MUÑOZ, R. A. A.; TAKEUCHI, R. M.; JANEGITZ, B. C.; SANTOS, A. L. A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltammetric determination of caffeic acid. **Microchemical Journal**, v. 158, n. Maio, p. 105297, 2020.

ARVAND, M.; ELYAN, S.; ARDAKI, M. S. Facile one-pot electrochemical synthesis of zirconium oxide decorated poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite for the electrocatalytic oxidation and detection of progesterone. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 281, n. April 2018, p. 157–167, 2019.

ARVAND, M.; HEMMATI, S. Analytical methodology for the electro-catalytic determination of estradiol and progesterone based on graphene quantum dots and poly(sulfosalicylic acid) co-modified electrode. **Talanta**, v. 174, n. May, p. 243–255, 2017a.

ARVAND, M.; HEMMATI, S. Magnetic nanoparticles embedded with graphene quantum dots and multiwalled carbon nanotubes as a sensing platform for electrochemical detection of progesterone. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 238, p. 346–356, 2017b.

ASSUMPÇÃO, M. H. M. T.; DE SOUZA, R. F. B.; RASCIO, D. C.; SILVA, J. C. M.; CALEGARO, M. L.; GAUBEUR, I.; PAIXÃO, T. R. L. C.; HAMMER, P.; LANZA, M. R. V.; SANTOS, M. C. A comparative study of the electrogeneration of hydrogen peroxide using Vulcan and Printex carbon supports. **Carbon**, v. 49, n. 8, p. 2842–2851, 2011.

BAIG, N.; SAJID, M.; SALEH, T. A. Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for

electroanalytical applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 47–61, 2019.

BALZER, B. W. R.; DUKE, S.; HAWKE, C. I., STEINBECK, K. S. The effects of estradiol on mood and behavior in human female adolescents: a systematic review. **European Journal of Pediatrics**, v. 174, n. 3, p. 289–298, 2015.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods**. Interscience, New York, 2001.

BARREIROS, L.; QUEIROZ, J. F.; MAGALHÃES, L. M.; SILVA, M. T.; SEGUNDO, M. Analysis of 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 243–262, 2016.

BEITOLLAHI, H.; MOHAMMADI, S. Z.; SAFAEI, M. TAJIK, S. Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: A review. **Analytical Methods**, v. 12, n. 12, p. 1547–1560, 2020.

BISWAS, S.; SHAPIRO, C. A.; KRANZ, W. L.; MADER, T. L.; SHELTON, D. P.; SNOW, D. D.; BARTELT-HUNT, S. L.; TARKALSON, D. D.; VAN DONK, S. J.; ZHANG, T. C.; ENSLEY, S. Current knowledge on the environmental fate, potential impact, and management of growth-promoting steroids used in the US beef cattle industry. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 68, n. 4, p. 325–336, 2013.

BITTENCOURT, S.; ALSSE, M. M.; SERRAT, B. M.; DE AZEVEDO, J. C. R. Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 43–53, 2016.

BRETT, C. M. A. Deep eutectic solvents and applications in electrochemical sensing. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 10, p. 143–148, 2018.

BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical sensing in solution-origins, applications and future perspectives. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, n. 7–8, p. 1487–1494, 2011.

BUNKE, D.; MORITZ, S.; BRACK, W.; HERRÁEZ, D. L.; POSTHUMA, L.; NUSS, M. Developments in society and implications for emerging pollutants in the aquatic environment. **Environmental Sciences Europe**, v. 31, n. 1, 2019.

CAMPUZANO, S.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. Diagnostics Strategies with Electrochemical Affinity Biosensors Using Carbon Nanomaterials as Electrode Modifiers. **Diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 2, 2016.

CAO, Y.; JIANG, Z.; DONG, Y.; DENG, X.; MEDOVAR, L.; STOVPCHENKO, G. Research on the bonding interface of high speed steel/ductile cast iron composite roll manufactured by an improved electroslag cladding method. **Metals**, v. 8, n. 6, p. 1–14, 2018.

CHEN, X.; SHI, Z.; HU, Y.; XIAO, X.; LI, G. A novel electrochemical sensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-doped nanoporous carbon for simultaneous determination of diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol in toner. **Talanta**, v. 188, p. 81–90, 2018.

CINTI, S.; MAZZARACCHIO, V.; CACCIOTTI, I.; MOSCONE, D.; ARDUINI, F. Carbon black-modified electrodes screen-printed onto paper towel, waxed paper and parafilm M<sup>®</sup>. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 1–12, 2017.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1671–1692, 2010.

COMPTON, R. G. & BANKS, C. E. **Understanding voltammetry**. 3a edition. New Jersey: World Scientific, 2018.

CORDEIRO, T. A. R. et al. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, n. November 2018, p. 327–332, 2019.

COUTO, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; QUINAZ, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, v. 146, p. 801–814, 2016.

DAS, A.; SANGARANARAYANAN, M. V. A sensitive electrochemical detection of progesterone using tin-nanorods modified glassy carbon electrodes: Voltammetric and computational studies. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 256, n. March 2019, p. 775–789, 2018.

DE AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.

DEKANSKI, A.; STEVANOVIC, J.; STEVANOVIC, R.; NIKOLIC, B. Z.; JOVANOVIC, V. M. Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, n. 8, p. 1195–1205, 2001.

DEROCO, P. B.; FATIBELLO-FILHO, O.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D. Effect of Different Carbon Blacks on the Simultaneous Electroanalysis of Drugs as Water Contaminants Based on Screen-printed Sensors. **Electroanalysis**, v. 31, n. 11, p. 2145–2154, 2019.

DEROCO, P. B.; FATIBELLO-FILHO, O.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D. Electrochemical determination of capsaicin in pepper samples using sustainable paper-based screen-printed bulk modified with carbon black. **Electrochimica Acta**, v. 354, p. 136628, 2020.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J.; GIUDICE, L. C.; HAUSER, R.; PRINS, G. S.; SOTO, A. M.; ZOELLER, R. T.; GORE, A. C. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, 2009.

DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Differential pulse voltammetric determination of nanomolar concentrations of antiviral drug acyclovir at polymer film modified glassy carbon electrode.

**Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 858–864, 2016.

FERRARI, A. G. M.; FOSTER, C. W.; KELLY, P. J.; BROWNSON, D. A. C.; BANKS, C. E. Determination of the electrochemical area of screen-printed electrochemical sensing platforms. **Biosensors**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2018.

FLORINDO, C.; OLIVEIRA, F. S.; REBELO, L. P. N.; FERNANDES, A. M.; MARRUCHO, I. M. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 2, n. 10, p. 2416–2425, 2014.

GEVAERD, A.; BLASKIEVICZ, S. F.; ZARBIN, A. J. G.; ORTH, E. S.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Nonenzymatic electrochemical sensor based on imidazole-functionalized graphene oxide for progesterone detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 112, n. April, p. 108–113, 2018.

GRANDI, G.; NAPOLITANO, A.; CAGNACCI, A. Metabolic impact of combined hormonal contraceptives containing estradiol. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 12, n. 7, p. 779–787, 2016.

GUPTA, P.; GOYAL, R. N.; SHIM, Y. B. Simultaneous analysis of dopamine and 5-hydroxyindoleacetic acid at nanogold modified screen printed carbon electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 213, p. 72–81, 2015.

HAJAR, M. D. S.; SUPRI, A. G.; HANIF, M. P. M.; YAZID, M. I. M. Effect of graphite loading on the electrical and mechanical properties of Poly (Ethylene Oxide)/Poly (Vinyl Chloride) polymer films. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 908, n. 1, 2017.

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, n. 1, p. 13–28, 2011.

HART, J. P.; CREW, A.; CROUCH, E.; HONEYCHURCH, K. V.; PEMBERTON, R. M. Some Recent Designs and Developments of Screen-Printed Carbon Electrochemical Sensors/Biosensors for Biomedical, Environmental, and Industrial Analyses. **Analytical Letters**, v. 37, n. 5, p. 789–830, 2004.

JANEGITZ, B. C.; DOS SANTOS, F. A.; FARIA, R. C.; ZUCOLOTTI, V. Electrochemical determination of estradiol using a thin film containing reduced graphene oxide and dihexadecylphosphate. **Materials Science and Engineering C**, v. 37, n. 1, p. 14–19, 2014.

JI, L.; WANG, Y.; WU, K.; ZHANG, W. Simultaneous determination of environmental estrogens: Diethylstilbestrol and estradiol using Cu-BTC frameworks-sensitized electrode. **Talanta**, v. 159, p. 215–221, 2016.

JONES-LEPP, T. L.; STEVENS, R. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: The interface between analytical chemistry and regulation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1173–1183, 2007.

KHAIRY, M.; AYOUB, H. A.; BANKS, C. E. Non-enzymatic electrochemical platform for parathion pesticide sensing based on nanometer-sized nickel oxide modified screen-printed electrodes. **Food Chemistry**, v. 255, n. October 2017, p. 104–111, 2018.

KHORSHED, A. A.; KHAIRY, M.; BANKS, C. E. Voltammetric determination of meclizine antihistamine drug utilizing graphite screen-printed electrodes in physiological medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 824, p. 39–44, 2018.

KIMMEL, D. W.; LEBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M. E.; CLIFFEL, D. E. Electrochemical sensors and biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 2012.

KU, S.; PALANISAMY, S.; CHEN, S. M. Highly selective dopamine electrochemical sensor based on electrochemically pretreated graphite and nafion composite modified screen printed carbon electrode. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 411, p. 182–186, 2013.

KUPCOVÁ, E.; REIFFOVÁ, K. Dispersive liquid–liquid microextraction as an effective preanalytical step for the determination of estradiol in human urine. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 12, p. 2620–2628, 2017.

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

LANGE, I. G.; DAXENBERGER, A.; SCHIFFER, B.; WITTERS, H.; IBARRETA, D.; MEYER, H. H. D. Sex hormones originating from different livestock production systems: Fate and potential disrupting activity in the environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 473, n. 1–2, p. 27–37, 2002.

LAVAGNINI, I.; ANTIOCHIA, R.; MAGNO, F. An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data. **Electroanalysis**, v. 16, n. 6, p. 505–506, 2004.

LAVIRON, E. Theoretical study of a reversible reaction followed by a chemical reaction in thin layer linear potential sweep voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 1–23, 1972.

LECOMTE, S.; HABAUZIT, D.; CHARLIER, T. D.; PAKDEL, F. Emerging estrogenic pollutants in the aquatic environment and breast cancer. **Genes**, v. 8, n. 9, 2017.

LEWIS, K. M.; ARCHER, R. D. pKa values of estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 2-methoxyestrone. **Steroids**, v. 34, n. 5, 1979.

LI, M.; LI, Y.; LI, D. LONG, Y. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 734, p. 31–44, 2012.

LIMA, C. D.; COUTO, R. A. S.; ARANTES, L. C.; MARINHO, P. A.; PIMENTEL, D. M.; QUINAZ, B.; DA SILVA, R. A. B.; RICHTER, E. M.; BARBOSA, S. L.; DOS SANTOS,

W. T. P. Electrochemical detection of the synthetic cathinone 3,4-methylenedioxypropylvalerone using carbon screen-printed electrodes: A fast, simple and sensitive screening method for forensic samples. **Electrochimica Acta**, v. 354, p. 136728, 2020.

MA, Y.; XIA, Q.; LIU, Y.; CHEN, W.; LIU, S.; WANG, Q.; LIU, Y.; LI, J.; YU, H. Production of Nanocellulose Using Hydrated Deep Eutectic Solvent Combined with Ultrasonic Treatment. **ACS Omega**, v. 4, n. 5, p. 8539–8547, 2019.

MARQUES, R.; VAZ, F. A. S.; POLONINIB, H. C.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Optimized separation method for estriol, 17- $\beta$ -estradiol and progesterone by capillary electrochromatography with monolithic column and its application to a transdermal emulsion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 609–618, 2015.

MARTÍN-POZO, L.; ALARCÓN-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ- GÓMEZ, R.; GARCÍA-CÓRCOLES, M. T.; ÇIPA, M.; ZAFRA-GÓMEZ, A. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. **Talanta**, v. 192, p. 508–533, 2019.

MASIKINI, M.; GHICA, M. E.; BAKER, P. G. L.; IWUOHA, E. I.; BRETT, C. M. A. Electrochemical Sensor Based on Multi-walled Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode for Detection of Estradiol in Environmental Samples. **Electroanalysis**, v. 31, n. 10, p. 1925–1933, 2019.

MOHANKUMAR, P.; AJAVAN, J.; MOHANRAI, T.; YASODHARAN, R. Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 167, n. May 2020, p. 108293, 2021.

MORAES, F. C.; ROSSI, B.; DONATONI, M. C.; DE OLIVEIRA, K. T.; PEREIRA, E. C. Sensitive determination of 17 $\beta$ -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 881, p. 37–43, 2015.

MORENO, M.; ARRIBAS, A. S.; BERMEJO, E.; CHICARRO, M.; ZAPARDIEL, A.; RODRÍGUEZ, M. C.; JALIT, Y.; RIVAS, G. A. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using carbon nanotube modified screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 2149–2156, 2010.

MOTIA, S.; BOUCHIKHI, B.; LLOBET, E.; BARI, N. E. Synthesis and characterization of a highly sensitive and selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer with gold nanoparticles modified screen-printed electrode for glycerol determination in wastewater. **Talanta**, v. 216, n. March, p. 120953, 2020.

MURUGANANTHAN, M.; YOSHIHARA, S.; RAKUMA, T.; UEHARA, N.; SHIRAKASHI, T. Electrochemical degradation of 17 $\beta$ -estradiol (E2) at boron-doped diamond (Si/BDD) thin film electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 9, p. 3242–3249, 2007.

MUZYKA, K.; SUN, J.; FERREJA, T. H.; ZHANG, W.; XU, G. Boron-doped diamond: Current progress and challenges in view of electroanalytical applications. **Analytical**

**Methods**, v. 11, n. 4, p. 397–414, 2019.

NEZAMI, A.; NOSRATI, R.; GOLICHENARI, B.; REZAEI, R.; CHATZIDAKIS, G. I.; TSATSAKIS, A. M.; KARIMI, G. Nanomaterial-based aptasensors and bioaffinity sensors for quantitative detection of 17 $\beta$ -estradiol. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 94, p. 95–105, 2017.

NGUNDI, M. M.; SADIK, O. A.; YAMAGUCHI, T.; SUYE, S. First comparative reaction mechanisms of  $\beta$ -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 1, p. 61–67, 2003.

NICHOLSON, R. S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 1351–1355, 1965.

NKUKU, C. A.; LESUER, R. J. Electrochemistry in deep eutectic solvents. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 46, p. 13271–13277, 2007.

ÖZCAN, A.; TOPÇUOĞULLARI, D. Voltammetric determination of 17-B-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.

OZKAN, S. A.; KAUFFMANN, J.-M.; ZUMAN, P. **Electroanalysis in Pharmaceutical Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. Springer, New York, 2015.

PABLOS, M. V.; GARCÍA-HORTIGÜELA, P.; FERNÁNDEZ, C. Acute and chronic toxicity of emerging contaminants, alone or in combination, in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 7, p. 5417–5424, 2015.

PAVEGLIO, G. C.; MILANI, F. A. S. C.; SAUER, A. C.; ROMAN, D.; MEYER, A. R.; PIZZUTI, L. Structure-physical properties relationship of eutectic solvents prepared from benzyltriethylammonium chloride and carboxylic acids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 3, p. 542–551, 2021.

PENA-PEREIRA, F.; BENDICHO, C.; PAVLOVIC, D. M.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; DÍAZ-ÁLVAREZ, M.; PAN, Y.; COOPER, J.; YANG, Z.; SAFARIK, I.; POSPISKOVA, K.; SEGUNDO, M. A.; PSILLAKIS, E. Miniaturized analytical methods for determination of environmental contaminants of emerging concern – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1158, 2021.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, n. 0, p. 3–27, 2015.

PING, J.; WU, J.; YING, Y. Development of an ionic liquid modified screen-printed graphite electrode and its sensing in determination of dopamine. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 12, p. 1738–1741, 2010.

PRADELA-FILHO, L. A.; ANDREOTTI, I. A. A.; CARVALHO, J. H. S.; ARAÚJO, D. A. G.; ORZARI, L. O.; GATTI, A.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L. JANEGITZ, B. C.

Glass varnish-based carbon conductive ink: A new way to produce disposable electrochemical sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 305, 2020.

PRATHISH, K. P.; CARVALHO, R. C.; BRETT, C. M. A. Electrochemical characterisation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film modified glassy carbon electrodes prepared in deep eutectic solvents for simultaneous sensing of biomarkers. **Electrochimica Acta**, v. 187, p. 704–713, 2016.

POWER, A. C.; MORRIN, A. Electroanalytical Sensor Technology. **Electrochemistry**, 2013.

RATHI, B. S.; KUMAR, P. S.; SHOW, P. L. A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, n. October 2020, p. 124413, 2021.

RAWLINSON, S.; McLISTER, A.; KANYONG, P.; DAVIS, J. Rapid determination of salicylic acid at screen printed electrodes. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 71–77, 2018.

RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; GOMES, N. O.; MACHADO, S. A. S.; OLIVEIRA, O. N. Simultaneous, ultrasensitive detection of hydroquinone, paracetamol and estradiol for quality control of tap water with a simple electrochemical method. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 848, p. 113319, 2019.

RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; GOMES, N. O.; CARVALHO, J. H. S.; MACHADO, S. A. S.; OLIVEIRA, O. N.; JANEGITZ, B. C. Simultaneous Detection of Quercetin and Carbendazim in Wine Samples Using Disposable Electrochemical Sensors. **ChemElectroChem**, v. 7, n. 14, p. 3074–3081, 2020.

REBELO, P.; PACHECO, J. G.; CORDEIRO, M. N. D. S.; MELO, A.; DELERUE-MATOS, C. Azithromycin electrochemical detection using a molecularly imprinted polymer prepared on a disposable screen-printed electrode. **Analytical Methods**, v. 12, n. 11, p. 1486–1494, 2020.

REVENGA-PARRA, M.; ROBLEDO, S. N.; MARTÍNEZ-PERIÑAN, E. GONZÁLEZ-QUIRÓS, M. M.; COLINA, A.; HERAS, A.; PARIENTE, F.; LORENZO, E. Direct determination of monosaccharides in honey by coupling a sensitive new Schiff base Ni complex electrochemical sensor and chemometric tools. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 312, n. February, p. 127848, 2020.

REZAEI, R.; FOROUGHI, M. M.; BEITOLLAHI, H.; ALIZADEH, R. Electrochemical Sensing of Uric Acid Using a ZnO/Graphene Nanocomposite Modified Graphite Screen Printed Electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 54, n. 11, p. 860–866, 2018.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 473–505, 2020.

RODIL, S. E. Infrared spectra of amorphous carbon based materials. **Diamond and Related Materials**, v. 14, n. 8, p. 1262–1269, 2005.

RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M.; PERALTA-HERNANDEZ, J. M.; GOONETILLEKE, A.;

BANDALA, E. R. Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361–380, 2017.

ROSY; YADAV, K.; AGRAWAL, B.; OYAMA, M.; GOYAL, R. N. Graphene modified Palladium sensor for electrochemical analysis of norepinephrine in pharmaceuticals and biological fluids. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 622–629, 2014.

ROUT, P. R.; ZHANG, T. C.; BHUNIA, P.; SURAMPALLI, R. Y. Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 753, p. 141990, 2021.

SHAMSIPUR, M.; PASHABADIA, A.; TAHERPOURA, A. A.; BAHRAMIA, K.; SHARGIC, H. Manganese mediated oxidation of progesterone in alkaline medium: Mechanism study and quantitative determination. **Electrochimica Acta**, v. 225, p. 292–302, 2017.

SHERIGARA, B. S.; KUTNER, W.; D'SOUZA, F. Electrocatalytic properties and sensor applications of fullerenes and carbon nanotubes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 9, p. 753–772, 2003.

SHRESTHA, S. L.; CASEY, F. X. M.; HAKK, H.; SMITH, D. J.; PADMANABHAN, G. Fate and transformation of an estrogen conjugate and its metabolites in agricultural soils. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 20, p. 11047–11053, 2012.

SHUMYANTSEVA, V. V.; BULKOA, T. V.; SIGOLAEVAC, L. V.; KUZIKOVA, A.V.; ARCHAKOV, A. A. I. Electroanalysis of myoglobin based on electropolymerized molecularly imprinted polymer poly-o-phenylenediamine and carbon nanotubes/screen printed electrode. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 468, n. 1, p. 213–216, 2016.

SIDDEEG, S. M.; ALSAIARI, N. S.; TAHOON, M. A.; REBAH, F. B. The application of nanomaterials as electrode modifiers for the electrochemical detection of ascorbic acid: Review. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 15, p. 3346, 2020.

SIFAKIS, S.; ANDROUTSOPOULOS, V. P.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 56–70, 2017.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

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

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159–173, 2003.

SUN, D.; DENG, Q.; LONG, J. Highly sensitive electrochemical sensor for estradiol based on the signal amplification strategy of Cu-BDC frameworks. **Journal of Solid State**

**Electrochemistry**, v. 22, n. 2, p. 487–493, 2018.

TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 94, p. 8–16, 2015.

TERUI, N.; FUGETSU, B.; TANAKA, S. Voltammetric behavior and determination of 17 $\beta$ -estradiol at multi-wall carbon nanotube-nafion modified glassy carbon electrode. **Analytical Sciences**, v. 22, n. 6, p. 895–898, 2006.

TRIVIÑO, J. J.; GÓMEZ, M.; VALENZUELA, J.; VERAC, A.; ARANCIBIA, V. Determination of a natural (17 $\beta$ -estradiol) and a synthetic (17 $\alpha$ -ethinylestradiol) hormones in pharmaceutical formulations and urine by adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 297, n. July, p. 126728, 2019.

VARODI, C.; POGACEAN, F.; GHEORGHE, M.; MIREL, V.; COROS, M.; BARBUTUDORAN, L.; STADEN, R. S.; PRUNEANU, S. Stone paper as a new substrate to fabricate flexible screen-printed electrodes for the electrochemical detection of dopamine. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 12, p. 1–13, 2020.

WONG, A.; SANTOS, A. M.; FAVAB, E. L.; FATIBELLO-FILHO, O. SOTOMAYOR, M. D. P. T. Voltammetric determination of 17 $\beta$ -estradiol in different matrices using a screen-printed sensor modified with CuPc, Printex 6L carbon and Nafion film. **Microchemical Journal**, v. 147, n. November 2018, p. 365–373, 2019.

XU, N.; XU, Y.; XU, S.; LI, J.; TAO, H. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: A Chinese perspective. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 215–224, 2012.

YANG, J.; ZHAO, Y.; LI, M.; DU, M.; LI, X. LI, Y. A review of a class of emerging contaminants: The classification, distribution, intensity of consumption, synthesis routes, environmental effects and expectation of pollution abatement to organophosphate flame retardants (opfrs). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, 2019.

YE, Z.; LI, Y.; WEN, J.; LI, K.; YE, B. Study of the voltammetric behavior of jatrorrhizine and its sensitive determination at electrochemical pretreatment glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 126, p. 38–45, 2014.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545–551, 2002.

YOU, H. H.; SONG, G. Review of endocrine disruptors on male and female reproductive systems. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 244, n. December 2020, p. 109002, 2021.

## APÊNDICE

### A) Análises de microscopia óptica

Figura 1. Micrografias ópticas do grafite em pó com aumento de (A) 10x e (B) 40x.

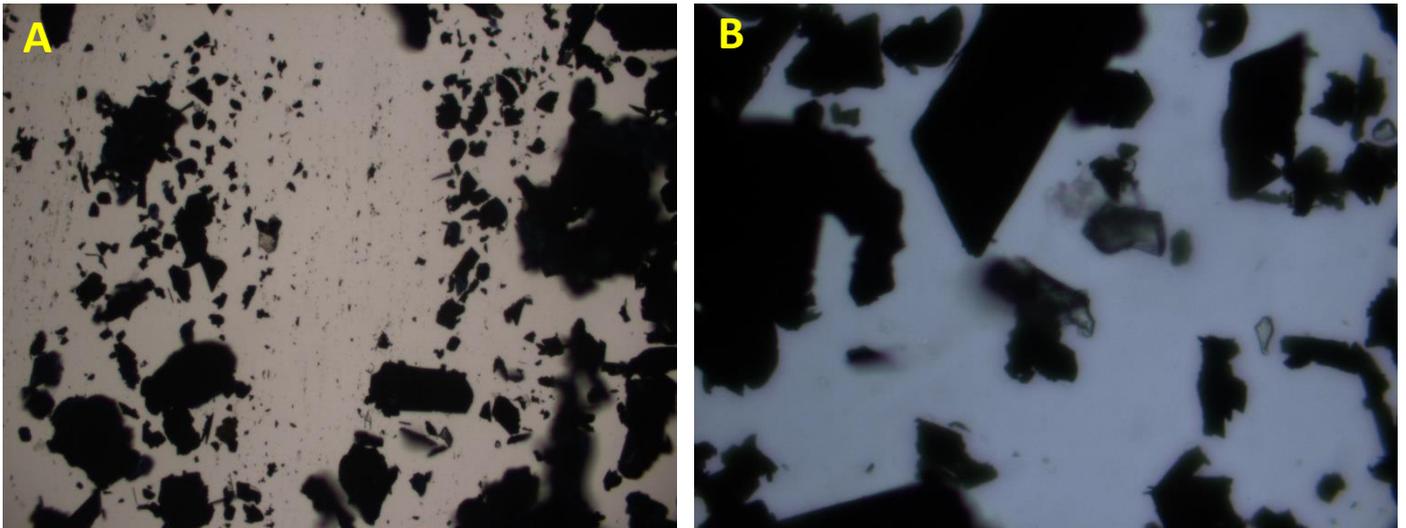


Figura 1. Micrografia óptica do carbono Printex 6L em pó com aumento de 10 x.

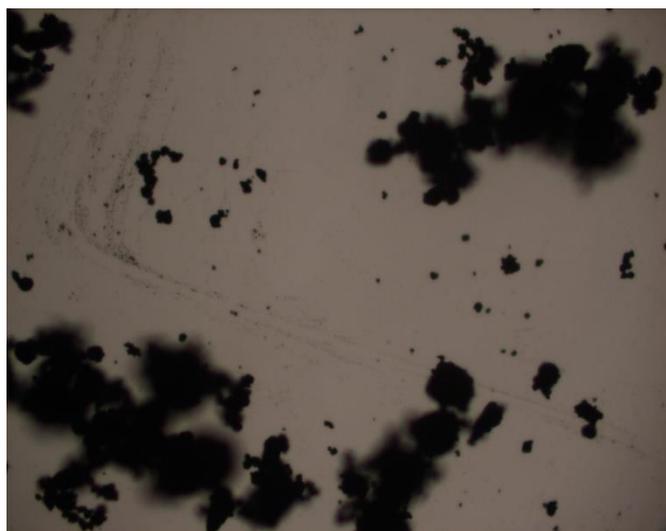


Figura 2. Micrografias ópticas da tinta de carbono Printex 6L com SE em 2 regiões diferentes com aumento de (A) 10x e (B) 40x.

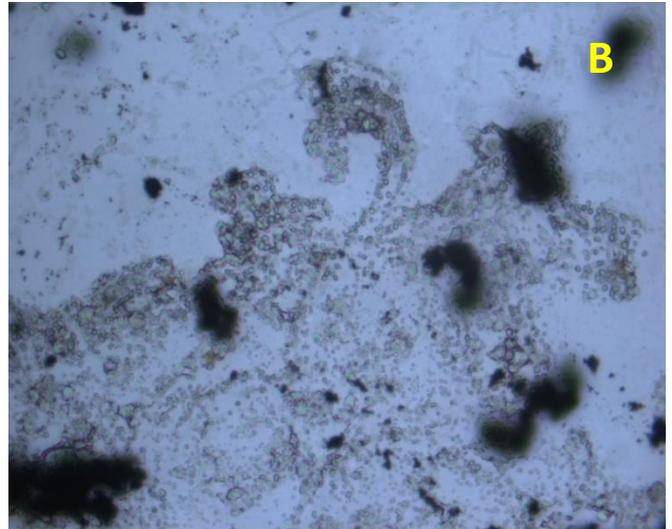
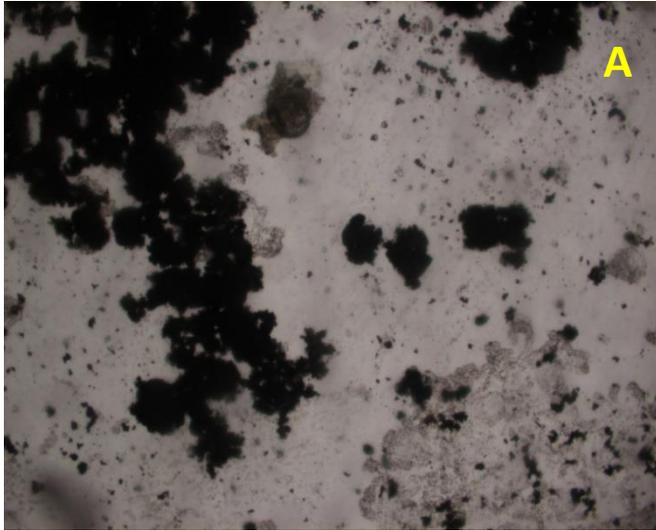
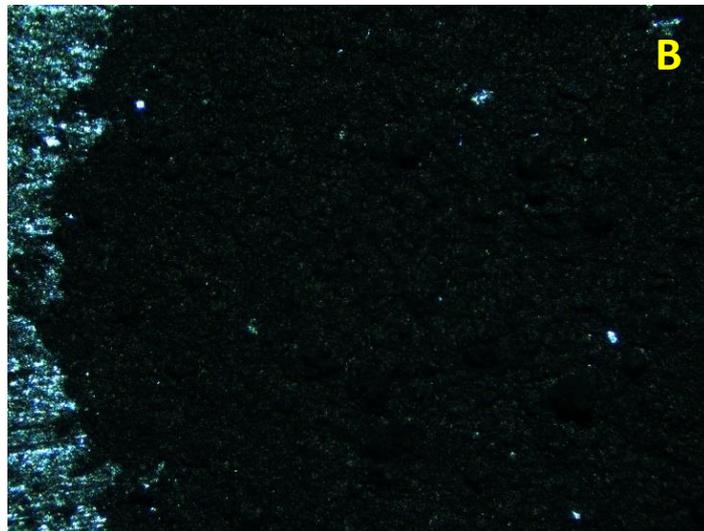
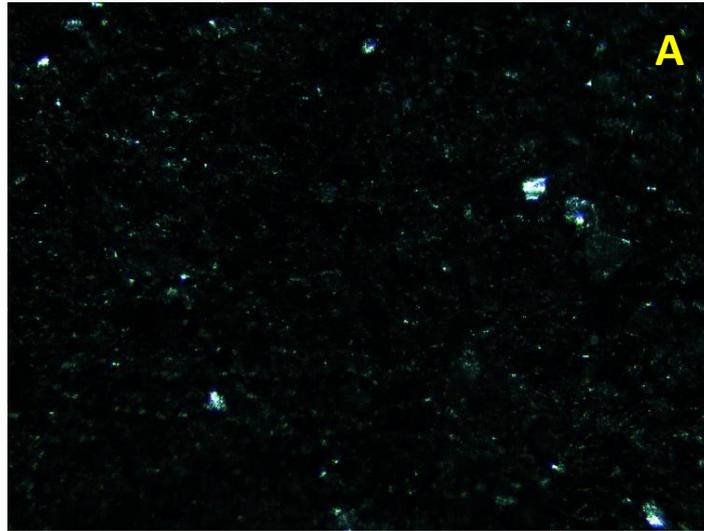


Figura 3. Micrografias ópticas do EIP (A), EIP-CP6L (B) e EIP-CP6L<sub>SE</sub> (C) com aumento de 10x.



## B) Medidas de adição-recuperação padrão de E2 e P4 em amostras de saliva artificial, urina sintética e água mineral

Figura 1. Voltamogramas de pulso diferencial da adição de E2 (adição 1:  $0,051 \mu\text{mol L}^{-1}$ , adição 2:  $0,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em amostras de saliva artificial, urina sintética e água mineral (linhas azuis). Adições padrões de E2 foram adicionadas nas concentrações de  $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$  (adição padrão 1) and  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  (adição padrão 2).

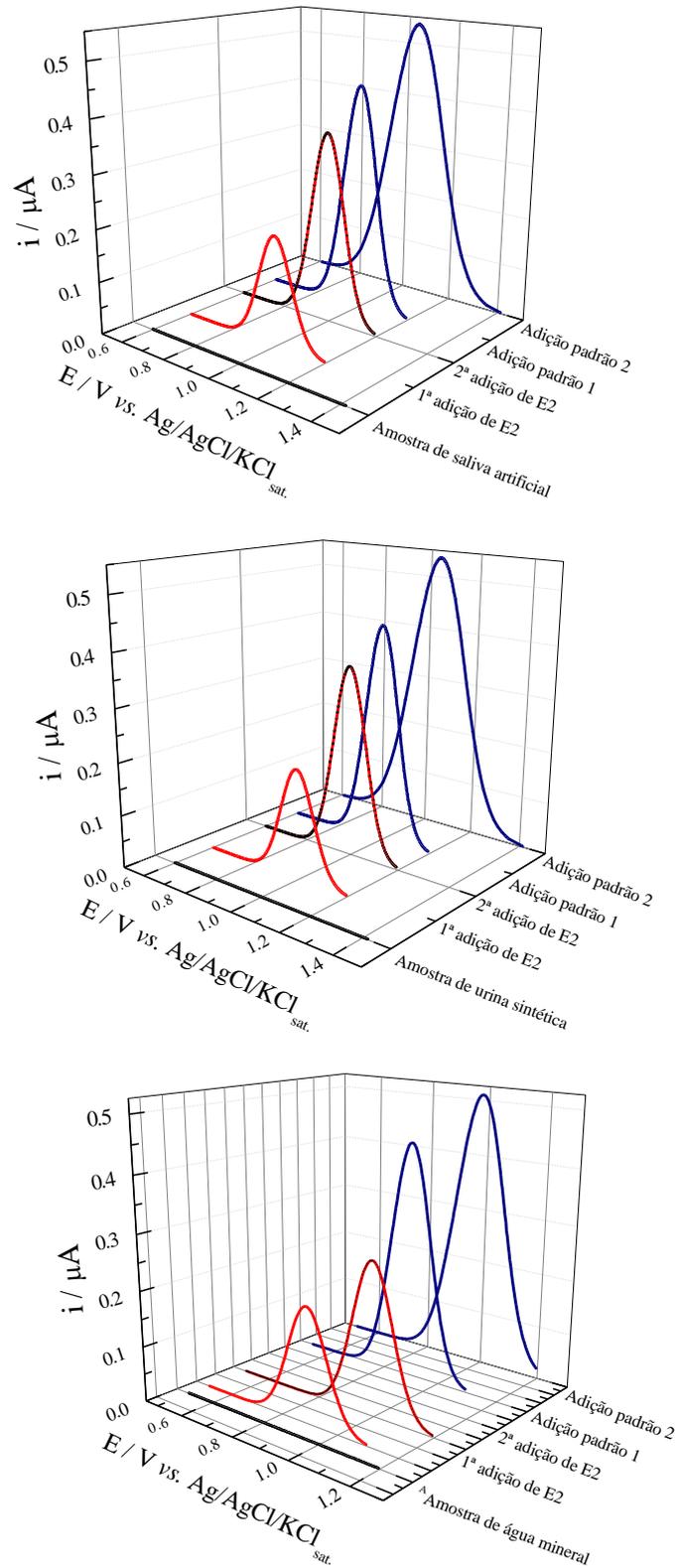


Figura 9. Voltamogramas de pulso diferencial da adição de P4 (adição 1:  $0,0042 \mu\text{mol L}^{-1}$ , adição 2:  $0,009 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em amostras de saliva artificial, urina sintética e água mineral (linhas azuis). Adições padrões de P4 foram adicionadas nas concentrações de  $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$  (adição padrão 1) and  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  (adição padrão 2).

