

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

DAIANE GABRIELA RIBEIRO

Determinação de 17β -estradiol com eletrodo grafite-ABS em sistema BIA com
detecção amperométrica

Uberlândia - MG

2024

DAIANE GABRIELA RIBEIRO

Determinação de 17β -estradiol com eletrodo grafite-ABS em sistema BIA com
detecção amperométrica

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Edmar Isaías de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim
Bezerra da Silva

Uberlândia - MG

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R484
2024 Ribeiro, Daiane Gabriela, 1986-
Determinação de 17beta-estradiol com eletrodo grafite-
ABS em sistema BIA com detecção amperométrica [recurso
eletrônico] / Daiane Gabriela Ribeiro. - 2024.

Orientador: Edmar Isaías de Melo.

Coorientador: Rodrigo Amorim Bezerra da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.337>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. I. Melo, Edmar Isaías de, 1970-,
(Orient.). II. Silva, Rodrigo Amorim Bezerra da, 1983-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 395, PPGQUI				
Data:	Vinte e três de julho de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	13h30min	Hora de encerramento:	16h50min
Matrícula do Discente:	12222QMI001				
Nome do Discente:	Daiane Gabriela Ribeiro				
Título do Trabalho:	Determinação de 17 β -estradiol com eletrodo grafite-ABS em sistema BIA com detecção amperométrica				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Eletroquímica Aplicada				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de dispositivos impressos em 3D para eletroanálise de contaminantes em amostras ambientais				
<u>ODS</u>	ODS 6 - Água potável e saneamento: garantir disponibilidade e manejo sustentável da água e saneamento para todos				

Reuniu-se, por webconferência, pelo *link* <https://meet.google.com/qqo-tphg-vnh>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta pelos professores doutores: **André Luiz dos Santos**, da Universidade Federal de Uberlândia; **André Santiago Afonso**, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; e **Edmar Isaías de Melo**, orientador(a) da candidato(a).

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, **Dr. Edmar Isaías de Melo**, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Edmar Isaias de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/07/2024, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luiz dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/07/2024, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Santiago Afonso, Usuário Externo**, em 23/07/2024, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5454341** e o código CRC **F5531080**.

Dedico este trabalho à minha família, pelo estímulo, carinho e compreensão durante toda esta trajetória. Dedico também ao meu orientador, Edmar Isaías de Melo, pela paciência e ensinamentos. Sobretudo dedico a Deus que me guia e sustenta meus passos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é a força que me sustenta durante toda minha vida.

À minha família, meu marido e meus filhos, minha avó e minha mãe, pela compreensão ao longo desta jornada, pelo carinho e apoio sempre.

Aos professores Dr. Edmar Isaías e Dr. Rodrigo Amorim pela amizade, confiança, orientação e paciência nesta caminhada acadêmica, contribuindo e incentivando para que eu alcançasse meus melhores resultados.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Prof. Dr. André Luiz dos Santos, Prof.^a Dra. Djenaine de Souza, Prof. Dr. André Santiago Afonso, pela aceitação do convite e grandiosas contribuições.

Aos colegas do RENAGRI pela colaboração e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos que sempre acreditaram e torceram por mim.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, por todo investimento em minha pesquisa.

Ao diretor do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, prof. Dr. Hudson de Paula Carvalho, por permitir meu afastamento, contribuindo para minha formação.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

(MARIE SKTODOWSKA CURIE)

RESUMO

O 17 β -estradiol (E2) é o principal hormônio sexual feminino, sendo utilizado também em formulações farmacêuticas (contraceptivo oral e em terapia de reposição hormonal). Devido a secreção deste hormônio pelo organismo, contaminando o meio aquático, o mesmo é considerado um poluente orgânico importante a ser monitorado, devido sua ação no organismo humano como desregulador endócrino. Desta forma, o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis, precisos e portáteis é de suma importância para sua quantificação "in loco" em diferentes matrizes. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologia para a determinação de E2 empregando eletrodo de trabalho composto por um substrato planar impresso com filamento isolante de acrilonitrila butadieno estireno (ABS) revestido com compósito condutor de grafite e ABS (G/ABS). Os estudos eletroquímicos iniciais do E2 foram investigados por voltametria cíclica (VC) em meio de eletrólito suporte tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹ e solução padrão do analito 50,0 μ mol L⁻¹, no qual foi observado um comportamento irreversível com um potencial de pico anódico (E_{pa}) em aproximadamente +0,85 V. Os estudos posteriores foram realizados em sistema de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica (AD) em condições otimizadas. Nestas condições, foi construída uma curva de calibração para E2, sendo obtida uma sensibilidade de 0,356 μ A μ mol⁻¹ L e uma faixa linear de 0,029 a 6,0 μ mol L⁻¹. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram de 0,009 μ mol L⁻¹ e 0,029 μ mol L⁻¹, respectivamente. A repetibilidade do sistema foi avaliada para dez injeções sequenciais de E2 em três níveis de concentração (0,5; 3,0 e 6,0 μ mol L⁻¹), sendo obtidos baixos coeficientes de variação (DPR = 8,6; 3,2 e 5,0%; n = 10, respectivamente). Além disso, a reprodutibilidade de preparação do sensor também apresentou baixo desvio (DPR = 5,5 %, n = 4), o que confirma uma fabricação reprodutível. A metodologia desenvolvida foi aplicada para 4 diferentes amostras de água de rio, obtendo-se concentrações variando de 2,23 a 63,84 μ mol L⁻¹. Para uma das amostras de água foram obtidas recuperações de 84, 89 e 129%, para concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 μ mol L⁻¹, respectivamente. Estes resultados sugerem que o eletrodo G/ABS em sistema BIA-AD é promissor para a determinação de E2 nas amostras avaliadas.

Palavras-chave: 17 β -estradiol; contaminantes ambientais; desregulador endócrino; compósito condutor; impressão 3D.

ABSTRACT

17 β -estradiol (E2) is the main female sex hormone and is also used in pharmaceutical formulations (oral contraceptives and hormone replacement therapy). Because the body secretes this hormone and contaminates the aquatic environment, it is considered an important organic pollutant to monitor, due to its action on the human body as an endocrine disruptor. The development of rapid, sensitive, accurate, and portable methods is therefore of the utmost importance for its quantification “in situ” in different matrices. This work aimed to develop a methodology for the determination of E2 using a working electrode composed of a planar substrate printed with an insulating filament of acrylonitrile butadiene styrene (ABS) coated with a conductive composite of graphite and ABS (G/ABS). The initial electrochemical studies of E2 were investigated by cyclic voltammetry (CV) in a 0.04 mol L⁻¹ Britton-Robinson (BR) buffer support electrolyte and 50.0 μ mol L⁻¹ analyte standard solution, in which irreversible behavior was observed with an anodic peak potential (E_{pa}) of approximately +0.85 V. Subsequent studies were carried out in a batch injection analysis (BIA) system with amperometric detection (AD) under optimized conditions. Under these conditions, a calibration curve was constructed for different concentrations of E2, obtaining a sensitivity of 0.356 μ A μ mol⁻¹ L and a linear range of 0.029 to 6.0 μ mol L⁻¹. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.009 μ mol L⁻¹ and 0.029 μ mol L⁻¹, respectively. The repeatability of the system was assessed for ten sequential injections of E2 at three concentration levels (0.5, 3.0, and 6.0 μ mol L⁻¹), and low coefficients variation were obtained (RSD = 8.6, 3.2, and 5.0%; n = 10, respectively). In addition, the reproducibility of the sensor preparation also showed a low deviation (PRD = 5.5%, n = 4), which confirms a reproducible manufacturing process. The methodology developed was applied to 4 different river water samples, obtaining concentrations ranging from 2.23 to 63.84 μ mol L⁻¹. For one of the water samples, 84, 89, and 129% recoveries were obtained for concentrations of 1.0, 3.0, and 5.0 μ mol L⁻¹, respectively. These results suggest that the G/ABS electrode in a BIA-AD system is promising for determining E2 in the samples evaluated.

Keywords: 17 β -estradiol; environmental contaminants; endocrine disruptor; conductive composite; 3D printing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do 17 β -Estradiol.	20
Figura 2 - Ilustração do processo de injeção do analito no sistema BIA mostrando as fases de variação de corrente em relação à presença de amostra na superfície do eletrodo.	23
Figura 3 - Localização da área de estudo e pontos de amostragem no córrego Mumbuca.	30
Figura 4 - Processo de fabricação do compósito condutor de grafite e ABS, e produção do eletrodo G/ABS.	33
Figura 5 - (A) Esquema e (B) imagens reais da célula impressa em ABS.	35
Figura 6 – (A) Imagem real da célula BIA; (B) Imagem real do sistema BIA; (C) Esquema do sistema BIA completo utilizado nas análises.	36
Figura 7 - Espectro FTIR do pó de grafite.	38
Figura 8 - Imagens de MEV obtidas da superfície do eletrodo G/ABS com ampliação de 1.000 vezes para: (A) eletrodo polido e (C) eletrodo não polido. Ampliação de 10.000 vezes para: (B) eletrodo polido e (D) eletrodo não polido. (E) Composição química qualitativa obtida por EDS.	40
Figura 9 - Variação de i_p vs. $v^{1/2}$ e os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) correspondentes (inserção) registrados em 0,5 M KCl contendo $2,0 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ para G/ABS. A velocidade de varredura potencial foi 10; 20; 30; 40; 50; 75 e 100 mV s^{-1} , para (■) Ox e (●) Red.	41
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (preto), e na presença de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de E2 no eletrodo G/ABS: (vermelho) 2º ciclo; (azul) 5º ciclo; (verde) 10º ciclo. Condições experimentais: Eletrólito suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV.	43
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos (1º ciclo) de uma solução de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3) com diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1}).	44
Figura 12 - (A) i_p vs v ; (B) i_p vs $v^{1/2}$ e (C) $\log i_p$ vs $\log v$	45
Figura 13 - Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) na presença de E2 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,00 a 8,00) sobre o eletrodo G/ABS. Condições experimentais: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV	46

Figura 14 - Gráficos, por VC, de (A) i_p vs pH e (B) $E_p(V)$ vs pH. Condições experimentais: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV ; tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,00 a 8,00); E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	47
Figura 15 - Mecanismo de reação proposto para a oxidação eletroquímica do estradiol.....	48
Figura 16 - Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) na presença de E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs (A) pH = 3,00 (abaixo do pKa); (B) pH = 10,46 (no valor do pKa); e (C) pH = 12,00 (acima do pKa). Condições experimentais: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV	49
Figura 17 - Distribuição das espécies de 17β -estradiol em função do pH.	50
Figura 18 - (A) Amperogramas obtidos na presença de E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos: KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (preto), Solução de Acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (vermelho) e Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (azul). (B) Corrente de pico média como histograma com teste de comparação de médias de Scott-Knott (p-valor = 0,05) para os eletrólitos avaliados. Condições experimentais: pH: 3,00; Volume de injeção: $150,0 \text{ } \mu\text{L}$; Vazão: $166 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$; Potencial de trabalho: $+1,4 \text{ V}$	51
Figura 19 - (A) Amperogramas obtidos para injeções em triplicata de E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,00) em diferentes potenciais aplicados (a= $+0,8$; b= $+1,0$; c= $+1,2$; d= $+1,4$; e= $+1,5$ e f= $+1,6 \text{ V}$). (B) Correntes de pico anódicas médias ($\pm\text{DPR}$) (n=3) injeções de solução de E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema BIA (E: 0,0 a $+1,6 \text{ V}$). Volume de injeção: $150,0 \text{ } \mu\text{L}$; Vazão: $166 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$	52
Figura 20 - (A) Amperogramas e (B) Correntes de pico anódicas médias ($\pm\text{DPR}$) para injeções em triplicata de solução de E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema BIA variando volumes de injeção (10 - $300 \text{ } \mu\text{L}$). Eletrólito: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); Potencial de trabalho: $+1,1 \text{ V}$; Vazão: $166 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$	53
Figura 21 - (A) Amperogramas e (B) Correntes de pico anódicas médias ($\pm\text{DPR}$) para injeções em triplicata de solução de E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema BIA variando vazão ($24 - 325 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$). Eletrólito: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); Potencial de trabalho: $+1,1 \text{ V}$; Volume de injeção: $100,0 \text{ } \mu\text{L}$	54
Figura 22 - (A) Respostas amperométricas para injeções em quadruplicata no sistema BIA de soluções padrão de E2 ($0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0$ e $6,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em ordem crescente e decrescente de concentração; (B) Respectivas curvas de calibração usando a corrente de pico média ($\pm\text{DPR}$) (n=4). Eletrólito: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); Potencial de trabalho: $+1,1 \text{ V}$; Volume de injeção: $100,0 \text{ } \mu\text{L}$; Vazão: $142 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$	55

Figura 23 - Amperogramas obtidos para injeções em triplicata de soluções padrão de E2 (a=1,0; b=0,5; c=0,2 e d=0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e n=8 injeções de solução do eletrólito suporte (E). Eletrólito: tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 3,00); Potencial de trabalho: +1,1 V; Volume de injeção: 100,0 μL ; Vazão: 142 $\mu\text{L s}^{-1}$	56
Figura 24 - Amperogramas obtidos no ensaio de repetibilidade, para injeções consecutivas de E2 (a=0,5; b=3,0 e c=6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (n=10). Eletrólito: tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 3,00); Potencial de trabalho: +1,1 V; Volume de injeção: 100,0 μL ; Vazão: 142 $\mu\text{L s}^{-1}$	57
Figura 25 - Corrente de pico médias ($\pm\text{DPR}$) (n=3) como histograma com teste de comparação de médias de Scott- Knott (p-valor = 0,05) para quatro diferentes eletrodos. Condições experimentais: $[\text{E2}] = 1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH = 3,00.....	58
Figura 26 - (A) Respostas amperométricas para injeções em quadruplicata no sistem BIA das amostras de água (M1, M2, M3 e M4) e de soluções de cada amostra adicionada com padrões de E2 nas concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Respectiva curva de calibração por adição de padrão usando a corrente de pico média ($\pm\text{DPR}$) (n=4). Eletrólito: tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 3,00); Potencial de trabalho: +1,1 V; Volume de injeção: 100,0 μL ; Vazão: 142 $\mu\text{L s}^{-1}$	61
Figura 27 - (A) Respostas amperométricas para injeções em quadruplicata no sistem BIA das seguintes concentrações do padrão E2 adicionado (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para amostras de água fortificadas com padrão de E2 em três níveis de concentração (1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) respectivas curvas de calibração por adição de padrão usando a corrente de pico média ($\pm\text{DPR}$) (n=4).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de reagentes e materiais utilizados.	28
Tabela 2 – Fatores de diluição por amostra.	30
Tabela 3 - Parâmetros avaliados e otimizados para quantificação de E2 utilizando o G/ABS.	54
Tabela 4 - Resultados obtidos ao reduzir gradualmente a concentração de E2 de 1,00 para 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	56
Tabela 5 - Características analíticas para BIA-AD com G/ABS na determinação de E2 nas condições otimizadas.	59
Tabela 6 - Comparação do método proposto (BIA-AD com G/ABS) com outros métodos para determinação de E2 reportados na literatura.	60
Tabela 7 - Valores de recuperação obtidos por análise em BIA-AD com G/ABS após dopagem da amostra M1 com padrões de E2 (1,0, 3,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	65

LISTAS DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

3D – Três Dimensões

ABS – Acrilonitrila Butadieno Estireno (do inglês “Acrylonitrile Butadiene Styrene”)

AD – Detecção Amperométrica (do inglês “Amperometric Detection”)

AEA – Área Eletroquimicamente Ativa

AG – Área Geométrica

AuNPs – Nanopartículas de Ouro (do inglês “gold nanoparticle”)

BIA – Análise por Injeção em Batelada (do inglês “Batch Injection Analysis”)

BIA-AD – Análise por Injeção em Batelada com Detecção Amperométrica (do inglês “Batch Injection Analysis with Amperometric Detection”)

BR – Britton-Robinson

CAD – projeto e desenho assistidos por computador (do inglês “Computer Aided Design”)

CB – Negro de Fumo (do inglês “carbon black”)

CB/PLA - Negro de Fumo / Ácido Polilático (do inglês “carbon black/polylactic acid”)

CBGC – Eletrodo de Carbono Vítreo/Negro de Fumo (do inglês “Carbon Black/Glassy Carbon Electrode”)

CE – Eletrodo Auxiliar (do inglês “counter electrode”)

CMADS – Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável

DPR – Desvio Padrão Relativo

E1 – Estrona

E2 – 17 β -estradiol

E3 – Estriol

EDC – Composto Desregulador Endócrino (do inglês “Endocrine Disruptor Compound”)

E_p – Potencial de Pico

EM – Efeito de matriz

FDM – Modelagem por Deposição Fundida (do inglês “Fused Deposition Modeling”)

FTIR – Espectroscopia em infravermelho com transformada de Fourier (do inglês “Fourier Transform Infrared Spectroscopy”)

G/ABS – Compósito condutor de Grafite e ABS

i_p – Corrente de Pico

LD – Limite de Detecção (do inglês “Limit of Detection”)

LQ – Limite de Quantificação (do inglês “Limit of Quantification”)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MEV-EDS – Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva

MWCNTs – Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas (do inglês “multi-walled carbon nanotube”)

PLA – Ácido Polilático (do inglês “polilactic acid”)

RE – Eletrodo de referência (do inglês “reference electrode”)

STL – Linguagem triangular padrão (do inglês “Standard Triangle Language”)

TRH – Terapia de Reposição Hormonal

VC – Voltametria Cíclica (do inglês “Cyclic Voltammetry”)

VD – Detecção Voltamétrica (do inglês “Voltametric detection”)

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

VPD – Voltametria de Pulso Diferencial

VPN – Voltametria de Pulso Normal

WE – Eletrodo de Trabalho (do inglês “working electrode”)

v – Velocidade de Varredura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	17 β -ESTRADIOL	19
2.2	TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	21
2.3	TECNOLOGIA 3D FDM (MODELAGEM POR DEPOSIÇÃO FUNDIDA, DO INGLÊS “FUSED DEPOSITION MODELING”) NA ELETROANALÍTICA	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1	REAGENTES, MATERIAIS, SOLUÇÕES E AMOSTRAS	28
4.2	INSTRUMENTAÇÃO	31
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE GRAFITE	32
4.4	FABRICAÇÃO DO COMPÓSITO CONDUTOR DE GRAFITE E ABS E DO ELETRODO G/ABS	32
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO G/ABS POR MEV-EDS	34
4.6	CÁLCULO DA ÁREA ELETROQUIMICAMENTE ATIVA DO ELETRODO	34
4.7	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE GRAFITE	38
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO G/ABS POR MEV-EDS	39
5.3	CÁLCULO DA ÁREA ELETROQUIMICAMENTE ATIVA	41
5.4	RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO SENSOR G/ABS	42
5.5	CINÉTICA DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS	43
5.6	ESTUDO DO pH E ELETRÓLITO DE SUPORTE	46
5.7	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA BIA-AD	51
5.8	DESEMPENHO ANALÍTICO DO G/ABS	54
5.9	ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	61
6	CONCLUSÃO	66

7	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	67
8	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O 17 β -estradiol (E2) é o principal estrogênio em vertebrados, sendo associado ao sistema reprodutivo feminino e à manutenção das características sexuais femininas. O E2 também tem sido fabricado em grandes quantidades para ser usado como contraceptivo hormonal oral e para terapia de reposição hormonal (ALVES; FIORUCCI; ARRUDA, 2019). O E2 excretado da urina humana e animal contamina os recursos hídricos e os animais aquáticos. Como resultado, o E2 é um contaminante emergente e tornou-se um problema global (DONG *et al.*, 2018; SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021; WONG *et al.*, 2019)

Devido à presença do E2 no meio ambiente como desregulador endócrino é muito importante que se tenham métodos simples, rápidos, sensíveis e precisos para sua determinação. Vários métodos foram desenvolvidos para a detecção do E2, incluindo cromatografia líquida de alto desempenho (ZOU *et al.*, 2012), imunoenensaio de quimioluminescência (KANSO *et al.*, 2017) e ensaio de imunoabsorção enzimática (CARON; SHEEDY; FARENHORST, 2010). Entretanto, essas técnicas têm várias desvantagens como, por exemplo, custo elevado e impossibilidade de realização de ensaio no local da amostragem. Recentemente, as técnicas eletroquímicas têm recebido grande atenção devido a várias vantagens, como alta sensibilidade, o uso de instrumentos com custo menores que os de métodos convencionalmente utilizados, e serem portáteis, o que possibilita realização de análises no local de amostragem (DONG *et al.*, 2018; SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de metodologias de análise que utilizam técnicas eletroquímicas associadas a tecnologia de impressão 3D (três dimensões) para a construção de dispositivos eletroquímicos tem sido reportado na literatura (DE MORAES *et al.*, 2023; DE OLIVEIRA; DE MELO; DA SILVA, 2022; LOPES *et al.*, 2023; NOVAIS *et al.*, 2024). Artigos de revisão recentes resumem os avanços dos dispositivos eletroquímicos impressos em 3D (células e sensores), uma área de conhecimento com aumento exponencial no número de publicações nos últimos cinco anos (DE OLIVEIRA; DE MELO; DA SILVA, 2022). A impressão direta de sensores eletroquímicos requer termoplásticos que geralmente consistem em ABS (acrilonitrila butadieno estireno) ou PLA (ácido polilático) contendo grafeno ou negro de fumo (CB) para proporcionar condutividade (SILVA *et al.*, 2020; VELOSO *et al.*, 2023). Esses filamentos condutores são geralmente adquiridos comercialmente e, embora demonstrem aplicabilidade promissora na fabricação de sensores, normalmente necessitam de etapas de tratamento

químico-eletróquímico devido às baixas quantidades de material condutor que são incorporadas (DI-OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Um recente estudo apresentou um novo material termoplástico condutor fluido composto de partículas de grafite e ABS (G/ABS) utilizado para recobrir uma matriz polimérica de ABS (PETRONI *et al.*, 2021). Esse novo compósito G/ABS apresentou sensibilidade analítica significativamente melhor para detecção eletroquímica em comparação com eletrodos construídos com filamento comercial de CB/PLA amplamente utilizado para essa finalidade (ROCHA *et al.*, 2023). Outra vantagem da utilização do compósito grafite-ABS no revestimento de substratos de ABS para a fabricação de eletrodos é a possibilidade e facilidade de incorporação de modificadores, que objetivam melhorar o desempenho analítico dos sensores (PETRONI *et al.*, 2021).

Embora o desempenho eletroanalítico de um sistema dependa fortemente do material do eletrodo, a configuração da célula e a técnica utilizada também são igualmente importantes. Técnicas analíticas de fluxo, incluindo análise de fluxo e injeção em batelada, podem ser utilizadas como alternativa às medições estacionárias para aumentar o transporte de massa dos analitos para a superfície do eletrodo, resultando em alta sensibilidade e limites de detecção baixos (ARANTES *et al.*, 2023).

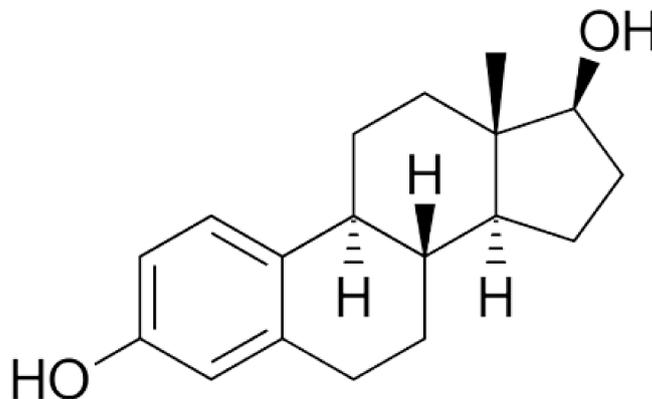
Neste sentido, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de metodologia com análise por injeção em batelada e detecção amperométrica (BIA-AD) empregando eletrodo de trabalho composto por um substrato planar impresso com filamento isolante de acrilonitrila butadieno estireno (ABS), revestido com compósito condutor de grafite e ABS (G/ABS) para a determinação de 17β -estradiol em amostras de águas naturais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 17 β -ESTRADIOL

Os estrogênios são hormônios derivados do colesterol, liberados por glândulas (córtex adrenal, testículos, ovário) e pela placenta durante a gravidez em humanos e animais (ALVES; FIORUCCI; ARRUDA, 2019) sendo também indicadores do estado de maturação sexual (SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021). No entanto, ele é mais do que um hormônio sexual, este hormônio esteroide controla quase todos os aspectos da saúde feminina e até mesmo masculina. Este hormônio é também responsável pela regulação de outras funções que não estão apenas relacionadas com o sistema reprodutor, como o crescimento e fortalecimento ósseo e a manutenção do cérebro (WONG *et al.*, 2019). Funções críticas como a homeostase da glicose, a homeostase lipídica, crescimento folicular, ovulação, entre uma miríade de outras funções, dependem dos seus sinais. O sexo, a idade e o estado de saúde são fatores que definem o nível de estrogênio no organismo. Em ambos os sexos, a depleção de estrogênio pode levar a problemas digestivos, osteoporose, doença de Alzheimer etc. (PATEL *et al.*, 2018).

Há três compostos principais que contribuem para a atividade hormonal estrogênica: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), e estriol (E3) (SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021). O estradiol (E2) ((17 β)-estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol) (Figura 1), é o principal estrogênio em vertebrados, sendo associado ao sistema reprodutivo feminino e à manutenção das características sexuais femininas (ALVES; FIORUCCI; ARRUDA, 2019). Na literatura é relatado que níveis anormais de 17 β -estradiol em mulheres podem causar problemas de saúde como o risco de desenvolver câncer da mama e câncer da bexiga, estando relacionado com câncer de pulmão, de ovários e de útero, podendo afetar o aumento de peso, a depressão, a fadiga, a alteração de humor, a dificuldade de dormir etc. (SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021) (WONG *et al.*, 2019). O E2 tem sido sintetizado em grandes quantidades para ser usado como contraceptivo hormonal oral e para terapia de reposição hormonal (TRH) devido a gama de doenças que estão ligadas ao estrogênio, no entanto, sua utilização não é isenta de efeitos secundários (ALVES; FIORUCCI; ARRUDA, 2019)(SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021).

Figura 1 - Estrutura química do 17 β -Estradiol.

Fonte: adaptado de (HAO *et al.*, 2011).

Estudos efetuados nas últimas décadas demonstraram que muitas substâncias químicas - tanto as de origem natural como as sintéticas - podem interferir no funcionamento correto do sistema endócrino e causar efeitos nocivos à saúde e à vida de animais e seres humanos. Estes compostos têm sido designados como compostos desreguladores endócrinos (EDCs). A concentração de EDC no ambiente é pequena, no entanto, uma exposição crônica pode causar efeitos biológicos nocivos nos animais e nos seres humanos (SPYCHALSKA *et al.*, 2020). Todos os dias, o E2 e os seus derivados são excretados pelos mamíferos através da urina e chegam às águas residuais juntamente com resíduos da indústria farmacêutica. Este hormônio é bioacumulativo e a sua presença no ambiente pode provocar graves complicações (mesmo em pequenas quantidades, apresenta alta toxicidade), interferindo na reprodução e desenvolvimento da fauna, como por exemplo, pela indução da produção hormonal fora do tempo correto, alteração da concentração natural de hormônios na corrente sanguínea e influência nos processos metabólicos. Além disso, há relatos de peixes expostos à hormônio que se feminizam; aves que se alimentam de peixes contaminados com altas concentrações de E2 também desenvolveram problemas, como o enfraquecimento do sistema imunológico (WONG *et al.*, 2019). O consumo contínuo de animais aquáticos como alimento, pelos seres humanos, leva então a uma elevada ingestão de E2, o que pode perturbar o sistema endócrino. Como resultado, o E2 é considerado um EDC, sendo assim um contaminante emergente e tornou-se um problema global (DONG *et al.*, 2018; SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021; WONG *et al.*, 2019).

Devido à presença do E2 no meio ambiente como poluente orgânico é muito importante que se tenham métodos simples, rápidos, sensíveis e precisos para sua determinação. Vários métodos foram desenvolvidos para a detecção do 17 β -estradiol, incluindo cromatografia líquida de alto desempenho (ZOU *et al.*, 2012), imunoenensaio de quimioluminescência (KANSO *et al.*, 2017) e ensaio de imunoabsorção enzimática (CARON; SHEEDY; FARENHORST, 2010). Entretanto, essas técnicas têm várias desvantagens como, por exemplo, custo elevado e impossibilidade de realização de ensaio no local da amostragem. Recentemente, as técnicas eletroquímicas têm recebido grande atenção devido a várias vantagens, como alta sensibilidade, o uso de instrumentos com custo menores que os de métodos convencionalmente utilizados, e serem portáteis, o que possibilita realização de análises no local de amostragem (DONG *et al.*, 2018; SUPCHOCKSOONTHORN *et al.*, 2021).

Na literatura, existem estudos sobre a determinação deste fármaco utilizando vários tipos de sensores eletroquímicos, como o sensor desenvolvido por (HAO *et al.*, 2011) que se baseia na modificação de um eletrodo de grafite com MWCNTs, com AuNPs e ácido poliacrílico, e utiliza a técnica layer-by-layer, obtendo limite de detecção (LD) de 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (MORAES *et al.*, 2015) determinaram o estradiol em amostras ambientais utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com uma suspensão contendo óxido de grafeno reduzido e uma porfirina de cobre, obtendo uma faixa de concentração linear de 0,1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LD de 5,3 nmol L^{-1} . Outros tipos de sensores também foram explorados, como os sensores híbridos de polímeros com impressão molecular (DES AZEVEDO *et al.*, 2013) e polímeros magnéticos nanoestruturados com impressão molecular (LAHCEN *et al.*, 2017). Porém a desvantagem destas técnicas são as etapas complexas de modificação da superfície do eletrodo e custo dos modificadores.

2.2 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas são alternativas interessantes, devido ao baixo custo, facilidade e portabilidade dos instrumentos, além da obtenção de resultados rápidos (ASADIAN; GHALKHANI; SHAHROKHIAN, 2019; NUNES *et al.*, 2016; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Estas técnicas fundamentam-se na relação entre a quantidade da substância com alguma propriedade elétrica como, condutividade elétrica, potencial, corrente ou carga elétrica (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Por meio dessas técnicas obtêm-se

informações qualitativas e quantitativas sobre a espécie eletroativa de interesse (ALEIXO, 2018).

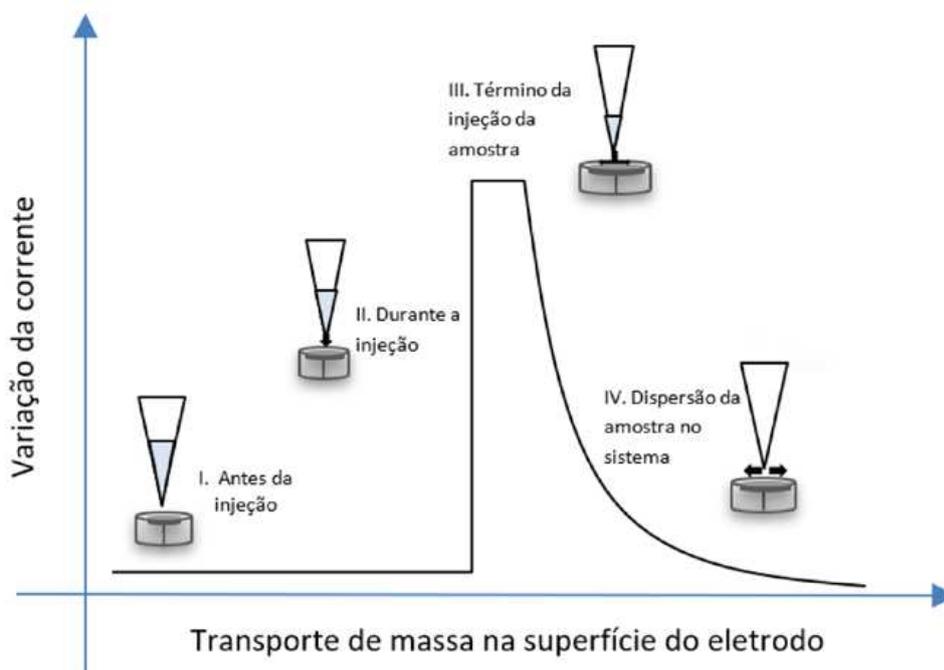
Existem diferentes técnicas eletroanalíticas como por exemplo, voltametria, potenciometria, amperometria, condutometria etc. (HARRIS, 2016). Dentre estas técnicas destacam-se as técnicas voltamétricas devido à grande quantidade de informações fornecidas e ao elevado desempenho analítico de algumas modalidades da voltametria. As voltametrias mais aplicadas são a cíclica (VC), onda quadrada (VOQ), pulso diferencial (VPD) e voltametria de pulso normal (VPN) que possuem perfis de acordo com a forma dos sinais de excitação aplicados (PACHECO *et al.*, 2013). A VC é uma técnica voltamétrica bastante aplicada, capaz de caracterizar os processos de reações redox gerados através da aplicação de uma diferença de potencial e da medição do sinal de corrente (FONSECA; PROENÇA; CAPELO, 2015). Ela opera através da aplicação controlada de uma varredura de potencial sobre um eletrodo de trabalho. Essa abordagem compreende uma progressão incremental de potencial até um ponto predeterminado, seguido por uma varredura inversa ao sentido inicial. O resultado desse processo é representado graficamente, mostrando a relação entre a corrente elétrica e o potencial, e é conhecido como voltamograma cíclico (WANG; JIANG; LI, 2001). A VC é uma das técnicas voltamétricas mais usuais quando se tem por finalidade adquirir informações qualitativas sobre o comportamento eletroquímico de uma molécula ou da superfície de um eletrodo, fornecendo rapidamente informações sobre a termodinâmica dos processos redox, da cinética de reações heterogêneas da transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (PACHECO *et al.*, 2013; WANG, 2006).

A amperometria tem por princípio de funcionamento a aplicação de um potencial constante em função do tempo, ou seja, a resposta de corrente obtida com o potencial aplicado decai gradativamente com o tempo da análise. Essa característica define a amperometria convencional como uma técnica usada para medir um valor de corrente a partir de um único potencial constante fixado, e uma vantagem associada é a baixa corrente capacitiva gerada no processo (DE RESENDE; DA SILVA; PEREIRA, 2020).

Análise por injeção em batelada (BIA) é uma técnica analítica, proposta por Wang e Taha (WANG; TAHA, 1991). A associação desse sistema à detecção amperométrica é uma ferramenta poderosa para a análise de alimentos, amostras ambientais e farmacêuticas (QUINTINO; ANGNES, 2004). Nos sistemas BIA, a amostra ou soluções padrão são injetadas com o auxílio de uma micropipeta, diretamente na superfície do eletrodo de trabalho (este modo de injeção é denominado “*wall jet*”) (DE RESENDE; DA SILVA; PEREIRA, 2020), que está imerso num grande volume de eletrólito de suporte. Esta abordagem apresenta várias

características desejáveis, como a utilização de pequenos volumes de amostra (tipicamente 10-150 μL), elevada sensibilidade, baixo custo, simplicidade e a possibilidade de desenvolver métodos analíticos com características portáteis para análise no local. Além disso, após o posicionamento dos três eletrodos (de trabalho, auxiliar e de referência ou pseudo-referência) e o enchimento da célula de BIA com eletrólito suporte, o sistema permite um elevado número de injeções, tipicamente, superior a duzentas injeções sem substituição de qualquer componente do sistema (PEREIRA *et al.*, 2016). A utilização de uma micropipeta eletrônica na etapa de injeção, aumenta a precisão da análise, em comparação com o uso de seringas ou micropipetas manuais, pois as condições - volume e velocidade de injeção - são programadas eletronicamente. Deste modo, as injeções, no sistema BIA, podem ser realizadas de forma bastante reprodutível (QUINTINO; ANGNES, 2004). Nesse sistema, a amostra é injetada e são gerados sinais transientes correspondentes às injeções por meio dos quais se obtém a corrente do processo redox (resposta analítica) proporcional de altura do pico de acordo com a concentração da amostra, que pode ser explicada a cada etapa da injeção do analito (DE RESENDE; DA SILVA; PEREIRA, 2020) (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração do processo de injeção do analito no sistema BIA mostrando as fases de variação de corrente em relação à presença de amostra na superfície do eletrodo.



Fonte: (DE RESENDE; DA SILVA; PEREIRA, 2020).

No primeiro momento (em I), antes da injeção do analito, a presença do eletrólito suporte de caráter inerte apresenta resposta constante de corrente, idealmente próxima a zero, formando uma linha base, que é indicativa de que não há troca ou transferência eletrônica entre o eletrodo e a solução. Na segunda fase (em II), durante a injeção do analito ocorre o transporte das espécies de interesse até a superfície do eletrodo e há um ganho elevado de corrente relacionado às reações redox que ocorrem no sistema; o transporte pode ser auxiliado por processos de convecção no sistema. Em seguida (em III), na etapa de término da injeção da amostra ou até que todo o analito seja transferido para a superfície do eletrodo, a corrente gerada por meio das reações redox é constante, enquanto acontecerem oxidação ou redução de espécies químicas. Ao fim da injeção da amostra (em IV), quando as substâncias participantes da reação redox, por um processo de transporte por difusão, saírem da interface eletrodo/solução para o seio da solução, ocorre uma queda brusca da corrente medida e o sinal de corrente tende a retornar para os valores iniciais antes da injeção da amostra ou padrão. Quando a condição inicial é atingida, a corrente se estabiliza novamente até que outra alíquota de amostra ou padrão seja injetada sobre a superfície do eletrodo, restando apenas uma corrente residual no sistema. Para que o estado inicial seja estabelecido mais rapidamente, geralmente é utilizada a agitação mecânica da solução (convecção), o que induz ainda um aumento da frequência analítica do método por permitir outra injeção de amostra em intervalo de tempo menor (DE RESENDE; DA SILVA; PEREIRA, 2020).

2.3 TECNOLOGIA 3D FDM (MODELAGEM POR DEPOSIÇÃO FUNDIDA, DO INGLÊS “FUSED DEPOSITION MODELING”) NA ELETROANALÍTICA

Artigos recentes de revisão resumem os avanços de dispositivos eletroquímicos impressos em 3D na construção de eletrodos, células e sensores (CARDOSO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021), uma área com aumento exponencial no número de publicações nos últimos anos (OLIVEIRA, 2023). Na eletroanalítica, a impressão 3D FDM é a tecnologia mais popular na construção de sistemas eletroquímicos devido ao baixo custo em comparação a outras tecnologias de manufatura aditiva, devido aos custos acessíveis das impressoras e dos filamentos poliméricos, além do uso de softwares gratuitos de código aberto (JOÃO *et al.*, 2020; RICHTER *et al.*, 2019). Nesse sentido, o desenvolvimento de eletrodos, células e sensores

personalizados fabricados por impressão 3D é uma tendência na Eletroquímica e Eletroanalítica (OLIVEIRA, 2023).

Na construção de dispositivos eletroquímicos de análise são utilizados filamentos poliméricos isolantes (por exemplo, ABS e PLA) e condutores, provenientes da mistura de PLA ou ABS isolante com material condutivo, como nanotubos de carbono, grafite, grafeno ou negro de fumo (CARDOSO *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA; DE MELO; DA SILVA, 2020, 2022). Estes filamentos condutores são normalmente adquiridos comercialmente e, embora demonstrem uma aplicabilidade promissora na fabricação de sensores funcionais, apresentam tipicamente uma insatisfatória resposta eletroquímica devido às baixas quantidades de material condutor que são incorporadas (PETRONI *et al.*, 2021). Em virtude disso, para ter seu desempenho melhorado os eletrodos produzidos por impressão 3D necessitam de execução de protocolos de tratamento de superfície da região a ser usada como sensor (JOÃO *et al.*, 2021). Pesquisadores de diferentes grupos de pesquisa têm explorado e proposto protocolos variados, desde a imersão em solventes orgânicos a tratamento eletroquímico com a aplicação de potenciais com tempo médio superior a 30 minutos, o que pode ser desvantagem no desenvolvimento de sensores eletroquímicos em larga escala (CASTRO *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de abordagens alternativas de fabricação baseadas em impressão 3D que possibilitem o uso de termoplásticos com altas quantidades de material condutor também é um tópico de suma importância e representa um avanço em relação a estudos anteriores na área. Um recente estudo (PETRONI *et al.*, 2021) apresentou um novo material termoplástico condutor fluido composto por partículas de grafite e ABS (G/ABS) utilizado para revestir uma matriz polimérica de ABS. Este novo compósito G/ABS mostrou uma sensibilidade analítica significativamente melhor para a detecção eletroquímica do paracetamol quando comparado com o filamento condutor comercial CB/PLA, amplamente utilizado para este fim. Este desempenho melhorado é atribuído à elevada quantidade de material condutor incorporado, sendo muito superior a quantidade encontrada nos filamentos comerciais, pois o revestimento acontece na base já impressa, superando a impossibilidade de usar grandes quantidades de material condutor que são necessárias para obter uma condutividade satisfatória para os termoplásticos (PETRONI *et al.*, 2021). O compósito grafite-ABS que reveste o substrato impresso em ABS no formato desejado pode ser utilizado para fabricação de eletrodos com elevada condutividade elétrica. Esta abordagem permite a utilização de termoplásticos com elevadas percentagens de material condutor, e mantém as vantagens da utilização da impressão 3D. Além disso os eletrodos G/ABS obtidos não necessitam de ativação da superfície, como os eletrodos fabricados com filamentos comerciais, sendo realizado apenas um passo de

polimento, ou seja, mais simples em comparação a ativação de eletrodos construídos com CB/PLA (DE OLIVEIRA; DE MELO; DA SILVA, 2020). Outra vantagem da utilização do compósito grafite-ABS no revestimento de substratos de ABS para a fabricação de eletrodos é a possibilidade e facilidade de incorporação de modificadores, que objetivam melhorar o desempenho analítico dos sensores, além do baixo custo em comparação aos filamentos condutivos comerciais (PETRONI *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como principal objetivo desenvolver uma metodologia eletroanalítica com análise por injeção em batelada e detecção amperométrica (BIA-AD) empregando eletrodo de trabalho composto por um substrato planar impresso com filamento isolante de acrilonitrila butadieno estireno (ABS), revestido com compósito condutor de grafite e ABS (G/ABS) para determinar 17β -estradiol em amostras de água de rio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Produzir os eletrodos de trabalho G/ABS;
- ✓ Investigar o comportamento eletroquímico do 17β -estradiol utilizando eletrodo de trabalho G/ABS por voltametria cíclica;
- ✓ Otimizar os parâmetros da técnica amperométrica acoplada a BIA para a detecção do E2;
- ✓ Obter os parâmetros analíticos para a detecção do 17β -estradiol em eletrodo de G/ABS nas condições otimizadas;
- ✓ Analisar as diferentes amostras de água de rio empregando a metodologia eletroanalítica proposta.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES, MATERIAIS, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes empregados apresentavam pureza analítica e foram utilizados sem purificação adicional (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista de reagentes e materiais utilizados.

Reagente/Material	Fornecedor
Acetato de sódio (CH_3COONa) – 99% m/m	Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) – 99,5% v/v	Sciavicco (Belo Horizonte, MG, Brasil)
Ácido acético (CH_3COOH) – 99,8% v/v	Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
Ácido bórico (H_3BO_3) – 99,5% m/m	Dinâmica (Diadema, SP, Brasil)
Ácido clorídrico (HCl) – 37% v/v	Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
Ácido fosfórico (H_3PO_4) – 85% v/v	Isofar (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Cloreto de potássio (KCl) – 99% m/m	Labsynth (Diadema, SP, Brasil)
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) – 99,5% v/v	Sciavicco (Belo Horizonte, MG, Brasil)
Hidróxido de sódio (NaOH) – 99% m/m	Isofar (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Pó de grafite – tamanho da partícula < 20 μm	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Padrão de 17 β -estradiol ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$) - $\geq 98\%$ m/m	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Filamento de ABS – 1,75mm de diâmetro	3D Fila (Belo Horizonte, MG, Brasil)
Lixas – granulometria 1500 e 2000	3M (Lojas locais)

Fonte: A autora (2024)

Todas as soluções usadas durante os experimentos foram preparadas com água purificada (resistividade 0,14 $\text{M}\Omega\text{ cm}$) fornecida por um sistema de purificação de água por osmose reversa Lucadema 50EG (São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Soluções estoque de E2 (5000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas mensalmente, através da dissolução em etanol de Pureza Analítica. Soluções estoque de E2 (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram preparadas semanalmente, através da diluição da solução estoque de 5000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol e eletrólito suporte, na proporção 1:1. Soluções de leitura de E2 foram preparadas diariamente

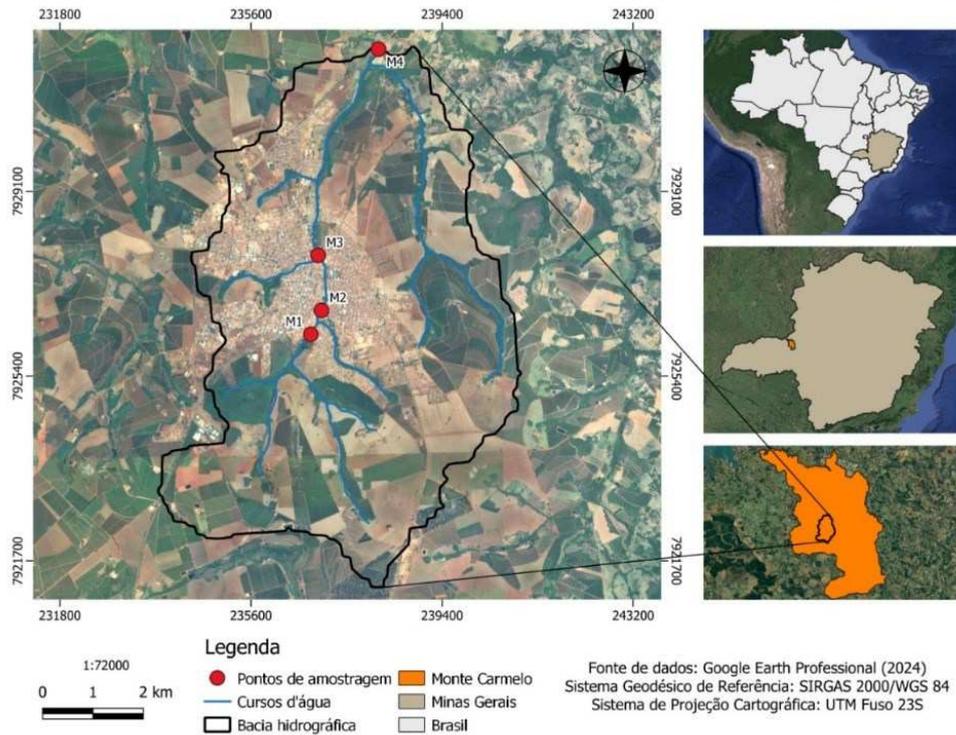
para prevenir a degradação, através da diluição da solução estoque de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte.

O tampão Britton-Robinson (BR) ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) foi utilizado como eletrólito de suporte para todas as medições eletroquímicas. Este tampão era composto por uma mistura dos ácidos acético, bórico e fosfórico, todos com uma mesma concentração ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$). Foi utilizada uma solução de hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) para ajustar os valores de pH.

A solução de acetato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e a solução de cloreto de potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) foram utilizadas para otimização do eletrólito de suporte, sendo utilizada uma solução de ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para ajuste do pH.

As amostras de água foram coletadas em diferentes pontos do Córrego Mumbuca, na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil (Figura 3), sendo denominadas de M1, M2 M3 e M4. Os quatro pontos de monitoramento estão inseridos no alto e médio curso, em regiões a montante da urbanização (ponto M1), na região urbanizada (pontos M2 e M3) e jusante da urbanização (ponto M4). As amostras foram recolhidas em garrafas de polietileno de alta densidade previamente limpas e armazenadas em geladeira até à análise. Antes da utilização, os recipientes foram lavados com detergente neutro e imersos numa solução aquosa de ácido nítrico a 10% (v/v) durante 24 horas, seguindo-se uma lavagem abundante com água purificada (APHA, AWWA, 2012).

Figura 3 - Localização da área de estudo e pontos de amostragem no córrego Mumbuca.



Fonte: A autora (2023)

Curvas de adição de padrão foram obtidas preparando soluções com amostra (volume de amostra conforme diluição descrita na Tabela 2) e E2 nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte (Tampão BR 0,04 mol L^{-1} , pH 3,00). Essas soluções foram analisadas no sistema BIA-AD (Figura 6).

Tabela 2 – Fatores de diluição por amostra.

AMOSTRA	FATOR DE DILUIÇÃO
M1	2,5
M2	2,5
M3	25
M4	10

Fonte: A autora (2024).

A amostra de água M1 foi fortificada com E2 em três níveis de concentração (1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Curvas de adição de padrão foram obtidas preparando soluções com amostra M1 fortificada (diluição 2,5 vezes) e E2 nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito suporte (Tampão BR 0,04 mol L^{-1} , pH 3,00). Essas soluções foram analisadas no sistema BIA-AD (Figura 6).

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

As medições eletroquímicas usando detecção voltamétrica (VD) e detecção amperométrica (AD) foram realizadas com um mini potenciostato Pocket Stat (Ivium Technologies, Eindhoven, Holanda) controlado pelo software Ivium Soft. Eletrodos comerciais de Ag/AgCl/KCl_{sat.} e platina (Pt) foram usados como eletrodo de referência e contra eletrodo, respectivamente, na detecção amperométrica. Na detecção voltamétrica foram utilizados eletrodos de referência de Ag/AgCl/KCl_{sat.} e contra eletrodo de platina (Pt) adaptados de (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996).

As células eletroquímicas foram fabricadas utilizando filamento de acrilonitrila butadieno estireno (ABS) (3Dfila; 1,75 mm) em impressora 3D/FMD 3D-printer (Crealty Ender-3, Shenzhen, China). Para análise por injeção em batelada (BIA) foi utilizada célula eletroquímica impressa em ABS adaptada de (RICHTER *et al.*, 2016) com pipeta eletrônica (Eppendorf® Multipette XStream).

O eletrodo G/ABS foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com instrumento TESCAN VEGA3 LMU e Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV-EDS) equipamento Thermo 200 (SEM-EDS). A caracterização do pó de grafite foi realizada por Espectroscopia em infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrofotômetro de infravermelho (Shimadzu modelo Prestige-21-IR). A caracterização do pó de grafite foi realizada por Espectroscopia em infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando um espectrofotômetro de infravermelho (Shimadzu modelo Prestige-21-IR) Todos os equipamentos da Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM-UFU).

Os seguintes equipamentos também foram usados: balança analítica (Shimadzu, AUY220), pHmetro (Tecnocon, MPA-210), agitador magnético (Hanna Instruments, HI 190M).

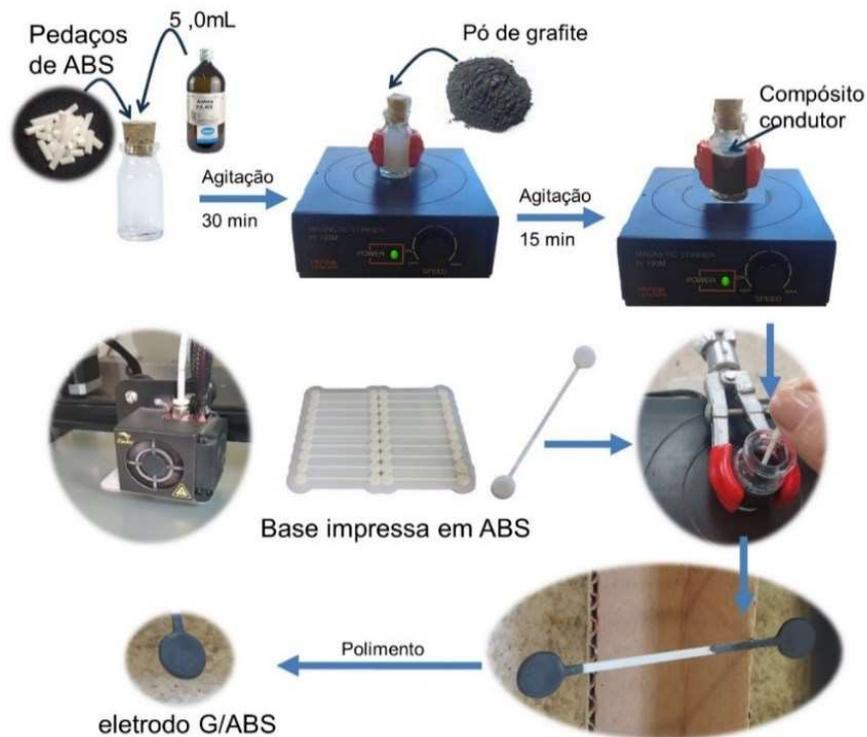
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE GRAFITE

O pó de grafite (sem nenhum tipo de preparação) foi caracterizado por FTIR utilizando um espectrofotômetro de infravermelho. Os dados da análise de FTIR foram obtidos na região de número de onda entre 400-4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} e foram registrados 32 *scans* para o material analisado.

4.4 FABRICAÇÃO DO COMPÓSITO CONDUTOR DE GRAFITE E ABS E DO ELETRODO G/ABS

O compósito termoplástico condutor de grafite/ABS (G/ABS) foi fabricado com o seguinte protocolo desenvolvido, já descrito na literatura (PETRONI *et al.*, 2021), e otimizado por nosso grupo (Figura 4): primeiro, pedaços do filamento ABS foram misturados com acetona (5 mL) em um recipiente de vidro com tampa, e colocados sob agitação magnética, por 30 minutos. Após este tempo foi adicionado o pó de grafite e a mistura foi deixada sob agitação por mais 15 minutos. A proporção de ABS/pó de grafite utilizada foi 50/50% (m/m), valor escolhido para este trabalho, seguindo o protocolo citado anteriormente (para o volume de 5 mL de acetona foi utilizada uma massa de 0,828 gramas, sendo 0,414 gramas de ABS e 0,414 gramas de grafite). Após esse procedimento, o compósito termoplástico G/ABS está pronto para a fabricação dos sensores eletroquímicos.

Figura 4 - Processo de fabricação do compósito condutor de grafite e ABS, e produção do eletrodo G/ABS.



Fonte: A autora (2023)

O protocolo usado para fabricar os eletrodos G/ABS também foi desenvolvido por (PETRONI *et al.*, 2021) e otimizado pelo nosso grupo (Figura 4). Primeiramente o modelo 3D desejado para o eletrodo de trabalho foi projetado usando o software de design FREE CAD - 0.20.2 gratuito (Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, EUA). O arquivo CAD foi então convertido para o formato STL e processado utilizando o software Ultimaker Cura 5.0 (Geldermalsen, Holanda) para obter o arquivo que contém os comandos de impressão. Uma impressora 3D FDM foi então utilizada para imprimir a base dos eletrodos na orientação horizontal usando filamento ABS não condutor. A resolução da camada foi de 0,20 mm e a velocidade de impressão foi de 50 mm/s. A base de ABS impressa tem as dimensões: diâmetro de 10,5 mm e 1,5 mm espessura. Foram impressas 40 unidades (bases de filamento não condutivo) de uma só vez. Posteriormente, essas bases de ABS impressas em 3D foram imersas por cerca de 5s no compósito termoplástico G/ABS (descrito na Seção 4.4), com agitação desligada no momento da imersão, e após esse tempo a base é retirada do compósito e deixada para secar (30s), sendo esse procedimento repetido por doze vezes promovendo o recobrimento da base de ABS. O processo é facilitado pela presença de acetona e ABS dissolvido no compósito. Os eletrodos são então deixados em repouso por 72 horas, em temperatura ambiente

para cura, gerando uma superfície mais rígida rica em grafite. Em seguida, os eletrodos têm sua superfície homogeneizada por polimento com lixa de granulometria 1500 e 2000 na presença de água purificada até obtenção de uma superfície lisa e plana. Após essas etapas, os eletrodos de G/ABS estão prontos para uso e devem ser armazenados em eletrólito de suporte para não ressecamento da superfície, mantendo sua resposta eletroquímica.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO G/ABS POR MEV-EDS

O sensor G/ABS preparado foi caracterizado por (MEV-EDS). As imagens MEV foram obtidas com um TESCA VEJA-3 LMU sob condição de vácuo e 15 kV de aceleração do feixe de elétrons. A composição elementar semiquantitativa dos materiais foi estimada por imagens de mapeamento químico obtidas com Thermo 200 SEM-EDS com resolução de 131 eV.

4.6 CÁLCULO DA ÁREA ELETROQUIMICAMENTE ATIVA DO ELETRODO

A área eletroquimicamente ativa (AEA) do eletrodo foi calculada aplicando a técnica de voltametria cíclica em velocidades de varredura variando de 10 a 100 mV.s⁻¹ em solução K₃[Fe(CN)₆] 2,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ e empregando-se a equação 01, de *Randles-Sevcik* (DEFFO *et al.*, 2021; OLDHAM, 1979; RANGLES, 1948; ŠEVČÍK, 1948).

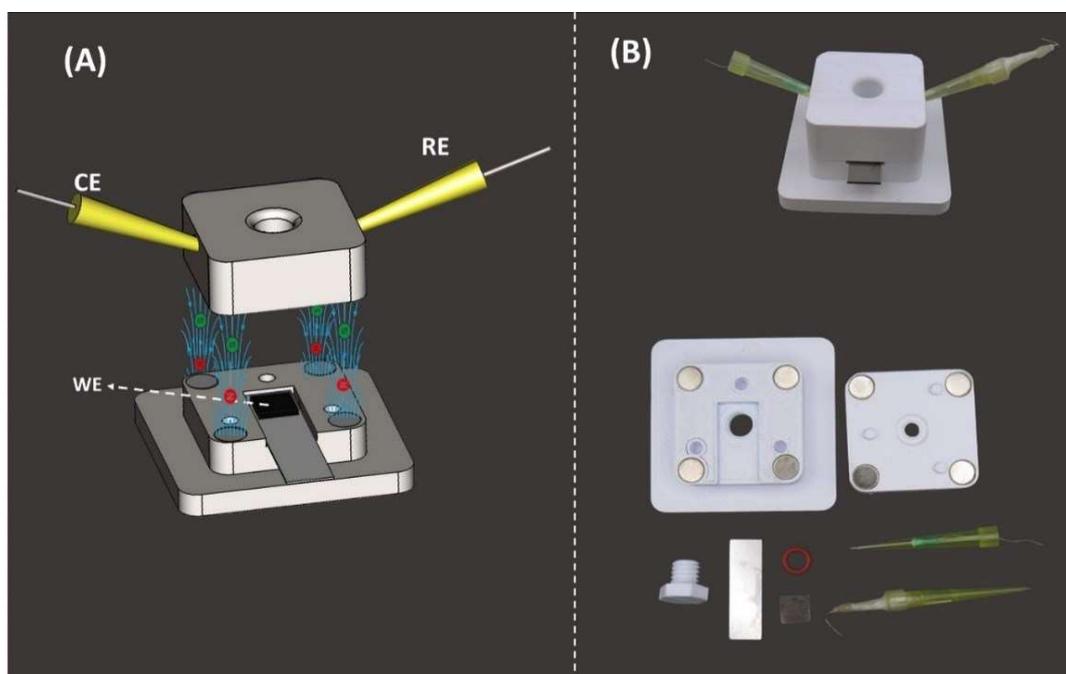
$$I_p = Kn^{3/2}AD^{1/2}C V^{1/2} \quad \text{equação 01}$$

Onde: I_p a corrente de pico em ampere (A), A a área ativa em cm², n : é o n° de elétrons da reação redox ($n=1$), D é o coeficiente de difusão do Ferricianeto (7,26x10⁻⁶ cm²/s) (KONOPKA; MCDUFFIE, 1970), K é constate (2,69x10⁵) (SHUKLA *et al.*, 2018), C é a concentração do íon Ferricianeto (2 x 10⁻⁶ mol/cm³), V é a velocidade de varredura (mV/s).

4.7 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

A voltametria cíclica (VC) foi empregada para estudos preliminares do comportamento eletroquímico do E2 no eletrodo G/ABS em tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (tampão BR). As medições eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente usando o potenciostato portátil e uma célula eletroquímica miniaturizada impressa em 3D feita de ABS, adaptada de (NOVAIS *et al.*, 2024) (Figura 5). Nesta célula, qualquer eletrodo de trabalho planar (com diferentes espessuras) é perfeitamente selado sem vazamento de solução ou ruptura do eletrodo entre duas partes da célula (tampa e base), utilizando ímãs de neodímio e um parafuso roscado, enquanto os eletrodos de referência e contra-eletrodos (em forma de ponta) são fixados na tampa. Neste trabalho, foi utilizado o eletrodo avaliado como eletrodo de trabalho (G/ABS), Ag/AgCl/KCl_{sat} como eletrodo de referência e eletrodo de platina como auxiliar, adaptados de (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996).

Figura 5 - (A) Esquema e (B) imagens reais da célula impressa em ABS.

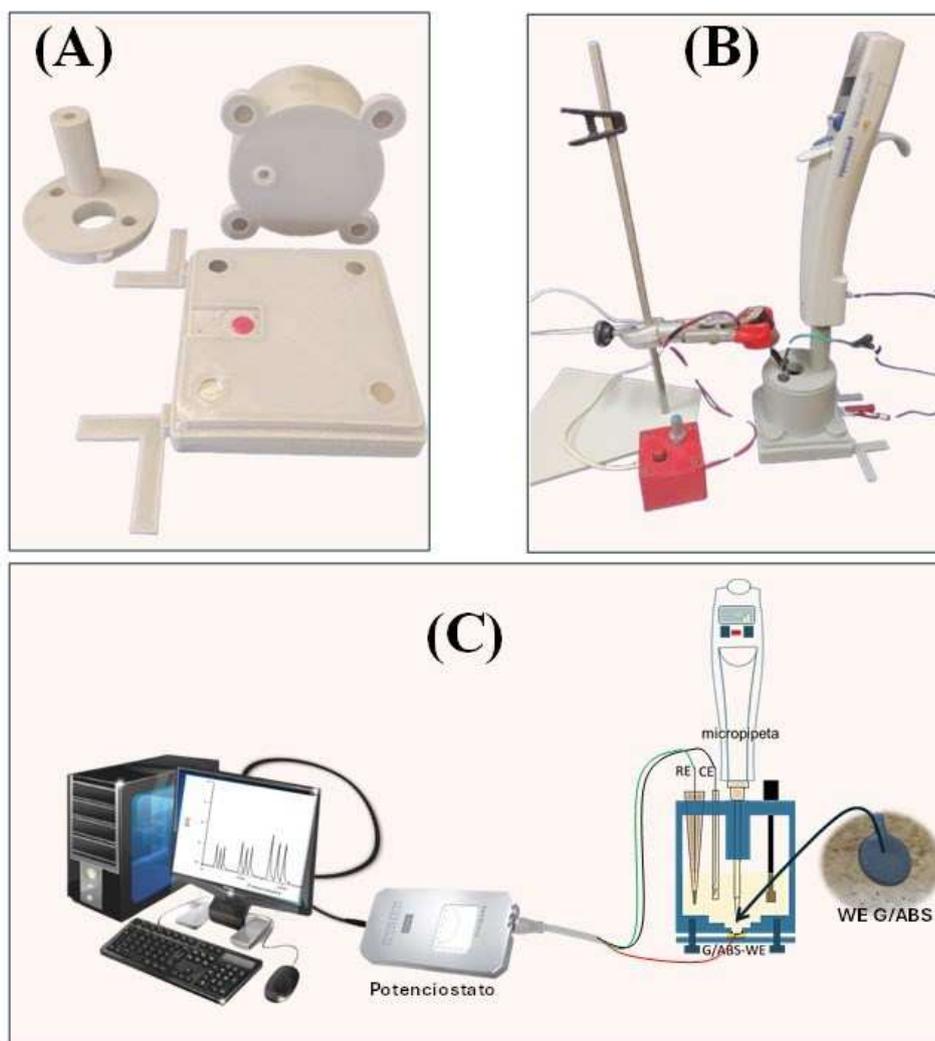


Fonte: Adaptado de (NOVAIS *et al.*, 2024).

A detecção amperométrica (AD) foi utilizada para determinação do E2 usando o eletrodo G/ABS em sistema BIA (Figura 6). As medições eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente usando o potenciostato portátil e uma célula eletroquímica impressa em

3D feita de ABS, adaptada de (RICHTER *et al.*, 2016) (Figura 6). A tampa superior desta célula utilizada era constituída por quatro orifícios para a montagem dos eletrodos de Pt, Ag/AgCl/KCl_{sat}, agitador mecânico e um suporte para a acomodação firme da micropipeta eletrônica. O volume interno da célula é de, aproximadamente, 80 mL, e o fechamento entre a parte superior e inferior da célula é feito por ímãs de neodímio, garantindo uma forte vedação para evitar possíveis vazamentos. Neste trabalho, foi utilizado o eletrodo avaliado como eletrodo de trabalho (G/ABS), eletrodo comercial de Ag/AgCl/KCl_{sat} como eletrodo de referência e eletrodo comercial de platina como auxiliar, ligados a um mini potenciostato interface via cabo com computador controlado pelo software Ivium Soft. As soluções foram injetadas no G/ABS colocado na célula de BIA (modo de jato na parede), no qual um potencial constante otimizado foi aplicado no eletrodo G/ABS para conversão redox do E2.

Figura 6 – (A) Imagem real da célula BIA; (B) Imagem real do sistema BIA; (C) Esquema do sistema BIA completo utilizado nas análises.



Fonte: Adaptada de RICHTER *et al.*, 2016.

4.8 CINÉTICA DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS

Com o propósito de entender a cinética de transferência de elétrons do E2 para a superfície do eletrodo G/ABS, foram realizados voltamogramas cíclicos com variação das velocidades de varredura de 10 a 100 mV s⁻¹, na presença de 50 μmol L⁻¹ de E2 e tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 3).

4.9 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

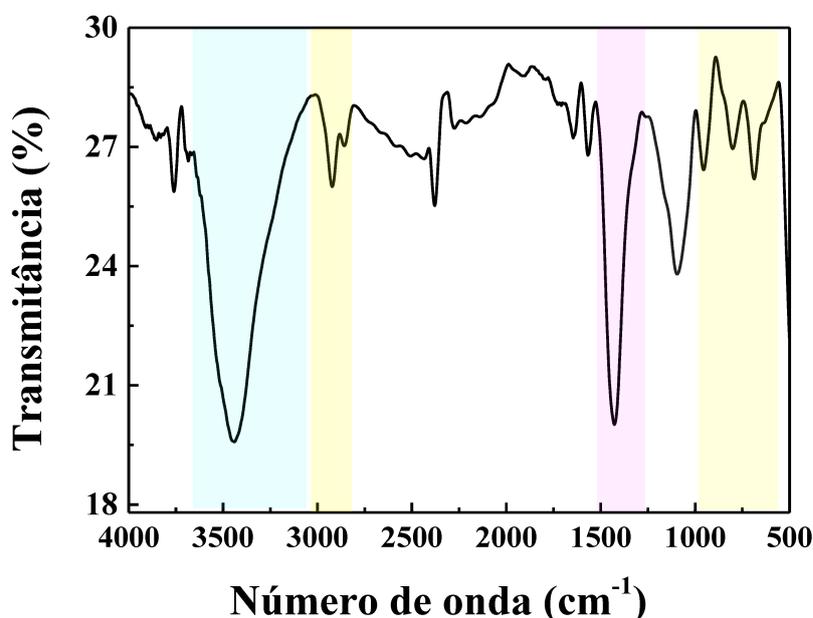
Com o intuito de determinar a configuração experimental mais eficaz em termos de corrente de pico do E2, foram realizadas otimizações de diversos parâmetros das medidas eletroquímicas. Os parâmetros otimizados incluíram o pH ideal da solução de análise, usando solução 50 μmol L⁻¹ de E2 em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, variando o pH na faixa de 2,0 a 8,0. O tampão BR foi empregado devido sua ampla capacidade tamponante, sendo possível variações de pHs numa faixa de 2,00 a 12,00 (BRITTON; ROBINSON, 1931). A escolha do eletrólito de suporte também foi realizada, sendo avaliadas três diferentes soluções (tampão BR 0,04 mol L⁻¹, solução de acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e KCl 0,5 mol L⁻¹) em pH 3, contendo 50 μmol L⁻¹ de E2. Também foram otimizados os parâmetros da BIA-AD, tais como: potencial aplicado, volume de injeção e vazão, realizados utilizando G/ABS, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, com pH ajustado para 3 e na presença de 50 μmol L⁻¹ de E2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE GRAFITE

A Figura 7 mostra o espectro obtido para o pó de grafite na Espectroscopia em infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Através das bandas observadas pode-se identificar os grupos funcionais presentes no grafite.

Figura 7 - Espectro FTIR do pó de grafite.



Fonte: A autora (2023)

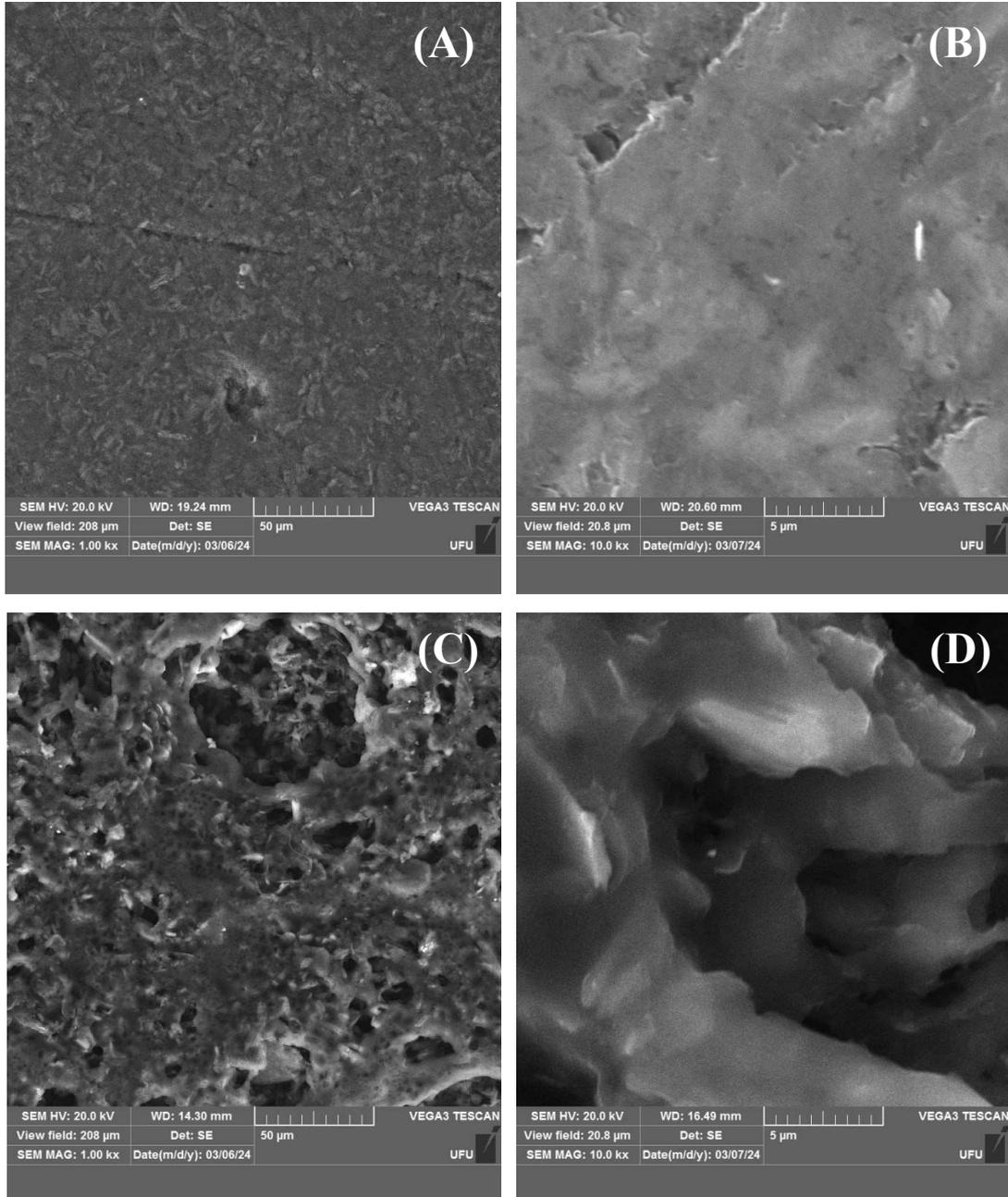
Observou-se bandas em 3446 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1429 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} , 950 cm^{-1} , 798 cm^{-1} e 692 cm^{-1} . De acordo com a análise de (OLIVEIRA; POLETTO; SEVERO, 2018) a banda 3446 cm^{-1} corresponde aos grupos -OH, a banda em 2928 cm^{-1} é característica de grupos C-H alifáticos (carbonos primários e terciários), 1429 cm^{-1} refere-se a grupos C=C, em 1097 cm^{-1} é característica de C-O. Em 950 cm^{-1} , 798 cm^{-1} e 692 cm^{-1} são bandas de anel aromático. Os grupos polares, especialmente os grupos hidroxila superficiais, resultam da formação de ligações de hidrogênio entre o grafite e as moléculas de água (ALAM; SHARMA; KUMAR, 2017).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO G/ABS POR MEV-EDS

Com o objetivo de avaliar as alterações morfológicas geradas diretamente na superfície do eletrodo G/ABS antes e após polimento, as imagens de MEV foram obtidas (Figura 8). A composição química qualitativa para a superfície de G/ABS foi investigada por MEV-EDS (Figura 8E). As Figuras 8C e 8D mostram as imagens da superfície do eletrodo sem polimento. É possível visualizar uma superfície bastante rugosa com grandes irregularidades, que podem ter sido formadas a partir da evaporação do solvente (acetona) no processo de produção dos sensores. Nas Figuras 8A e 8B estão as imagens da superfície do eletrodo polido, que passou por um processo de lixamento manual. Pode-se observar uma certa homogeneidade da superfície, com menos irregularidades quando comparadas ao eletrodo sem polimento. No caso do G/ABS a eficiência do sensor foi melhorada com o polimento, o que pode ser explicado pela maior exposição do grafite na superfície após o lixamento, resultando em uma eficiência maior na detecção do composto E2 por BIA-AD.

Os resultados da análise por EDS para G/ABS (Figura 8D) revela a predominância do elemento carbono (99,67%) com uma presença residual de silício (0,33%). Essa composição, com alta concentração de carbono, sugere uma superfície do eletrodo homogênea em relação a presença do grafite.

Figura 8 - Imagens de MEV obtidas da superfície do eletrodo G/ABS com ampliação de 1.000 vezes para: (A) eletrodo polido e (C) eletrodo não polido. Ampliação de 10.000 vezes para: (B) eletrodo polido e (D) eletrodo não polido. (E) Composição química qualitativa obtida por EDS.



(E)	
Elemento	Porcentagem (%)
C	99,67
Si	0,33
Total	100

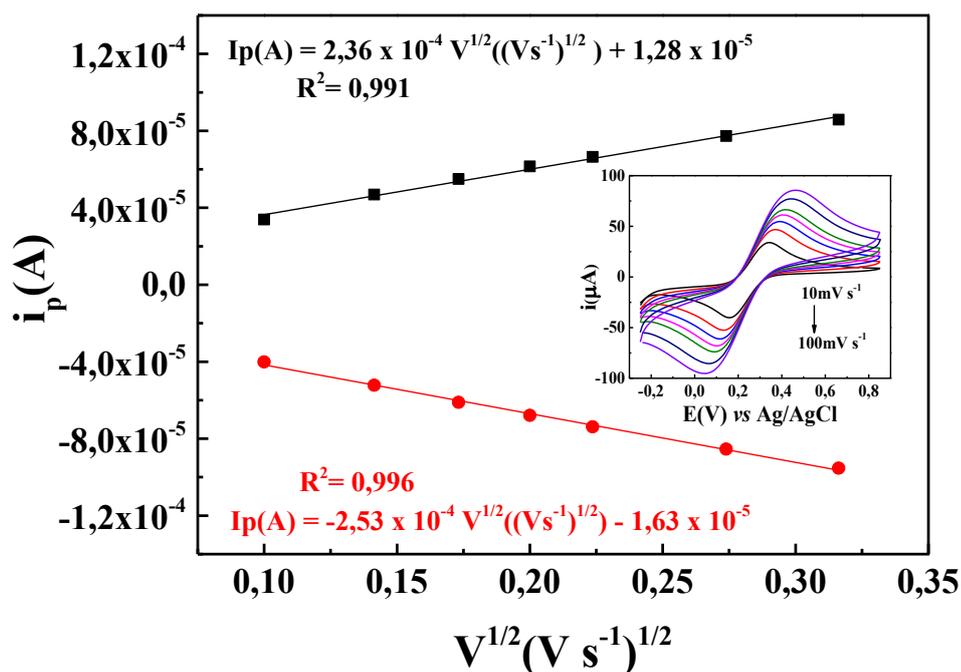
Fonte: A autora (2023).

5.3 CÁLCULO DA ÁREA ELETROQUIMICAMENTE ATIVA

A parte da superfície do eletrodo que é capaz de trocar elétrons com a espécie eletroativa é chamada de área eletroquimicamente ativa (AEA). Para estimar a AEA do sensor G/ABS foi empregada a técnica de voltametria cíclica e a variação das velocidades de varredura. Segundo a equação de *Randles-Sevcik*, existe uma relação entre a corrente de pico e a área ativa do eletrodo em sistemas reversíveis com transporte de massa controlado por difusão. A área efetiva de um eletrodo de trabalho pode ser obtida a partir da equação de *Randles-Sevcik* desde que conhecidos o número de elétrons, coeficiente de difusão, concentração da espécie eletroativa, velocidade de varredura e corrente de pico a uma dada temperatura (OLDHAM, 1979; RANGLES, 1948; ŠEVČÍK, 1948).

Na Figura 9 são apresentados os gráficos das corrente de pico anódica e catódica vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura para o sensor G/ABS, e estão plotados os voltamogramas cíclicos registrados em KCl 0,5 mol L⁻¹ na presença de 2,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]³⁻ em diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 mV s⁻¹).

Figura 9 - Variação de i_p vs. $v^{1/2}$ e os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) correspondentes (inserção) registrados em 0,5 M KCl contendo $2,0 \times 10^{-3}$ M [Fe(CN)₆]³⁻ para G/ABS. A velocidade de varredura potencial foi 10; 20; 30; 40; 50; 75 e 100 mV s⁻¹, para (■) Ox e (●) Red.



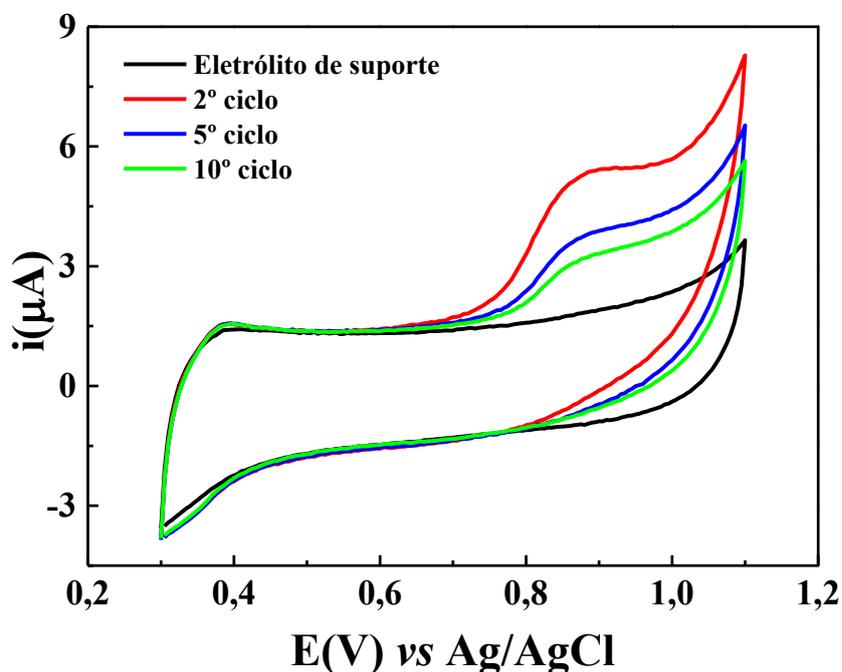
Fonte: A autora (2023).

O coeficiente angular do modelo foi usado para calcular a AEA do eletrodo G/ABS na equação de *Randles-Sevick* (equação 01). A AEA obtida foi de 0,1628 cm² e a área geométrica foi de 0,1256 cm² ($AG = \pi r^2$, com $r = 0,2$ cm). A área geométrica foi calculada utilizando o raio interno do anel de silicone ($r = 0,2$ cm) localizado abaixo da base da célula, que delimita a área de contato da solução com o sensor. A AEA foi superior à área geométrica em 29,6%, o que pode ser explicado pelo fato das interações entre a espécie eletroativa e as irregularidades presentes na superfície do eletrodo que não foram contabilizadas no cálculo da área geométrica. Outra contribuição para o aumento da área eletroativa pode estar relacionada ao processo de lixamento do G/ABS que pode ter removido resquícios do ABS e deixado mais exposto o grafite na superfície do eletrodo.

5.4 RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO SENSOR G/ABS

A resposta eletroquímica do sensor G/ABS para 17 β -estradiol foi investigada pela técnica de voltametria cíclica em 0,04 mol L⁻¹ de tampão BR (Figura 10). O voltamograma cíclico obtido na presença de E2, apresenta apenas um pico de oxidação em aproximadamente +0,85 V e não é evidenciado pico de redução, sugerindo um processo eletroquímico irreversível.

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (**preto**), e na presença de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de E2 no eletrodo G/ABS: (**vermelho**) 2º ciclo; (**azul**) 5º ciclo; (**verde**) 10º ciclo. Condições experimentais: Eletrólito suporte: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV .



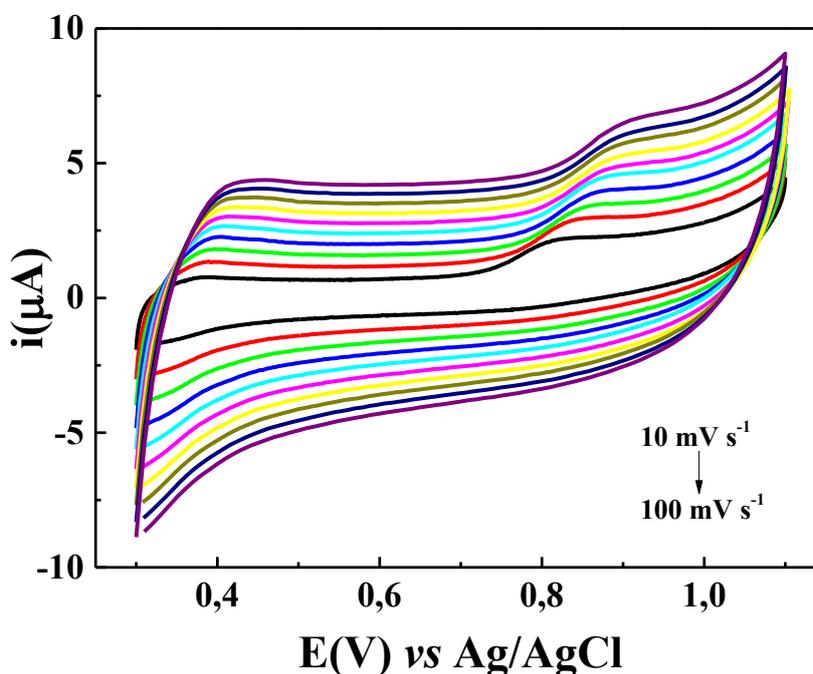
Fonte: A autora (2023).

Observando o comportamento eletroquímico do E2 pode-se perceber que a cada ciclo a resposta voltamétrica diminui. Esse comportamento pode ser atribuído à interações de produtos da reação redox com a superfície do eletrodo, interferindo na resposta voltamétrica. Este foi um dos motivos de escolha do método BIA-AD, pois a amostra ou soluções padrão são injetadas com o auxílio de uma micropipeta, diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, não apresentando perda de sinal analítico.

5.5 CINÉTICA DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS

Com o objetivo de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza de transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo G/ABS, realizou-se o estudo com variação das velocidades de varredura no intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} . A Figura 11 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos na presença de E2 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,00).

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos (1º ciclo) de uma solução de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3) com diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s^{-1}).

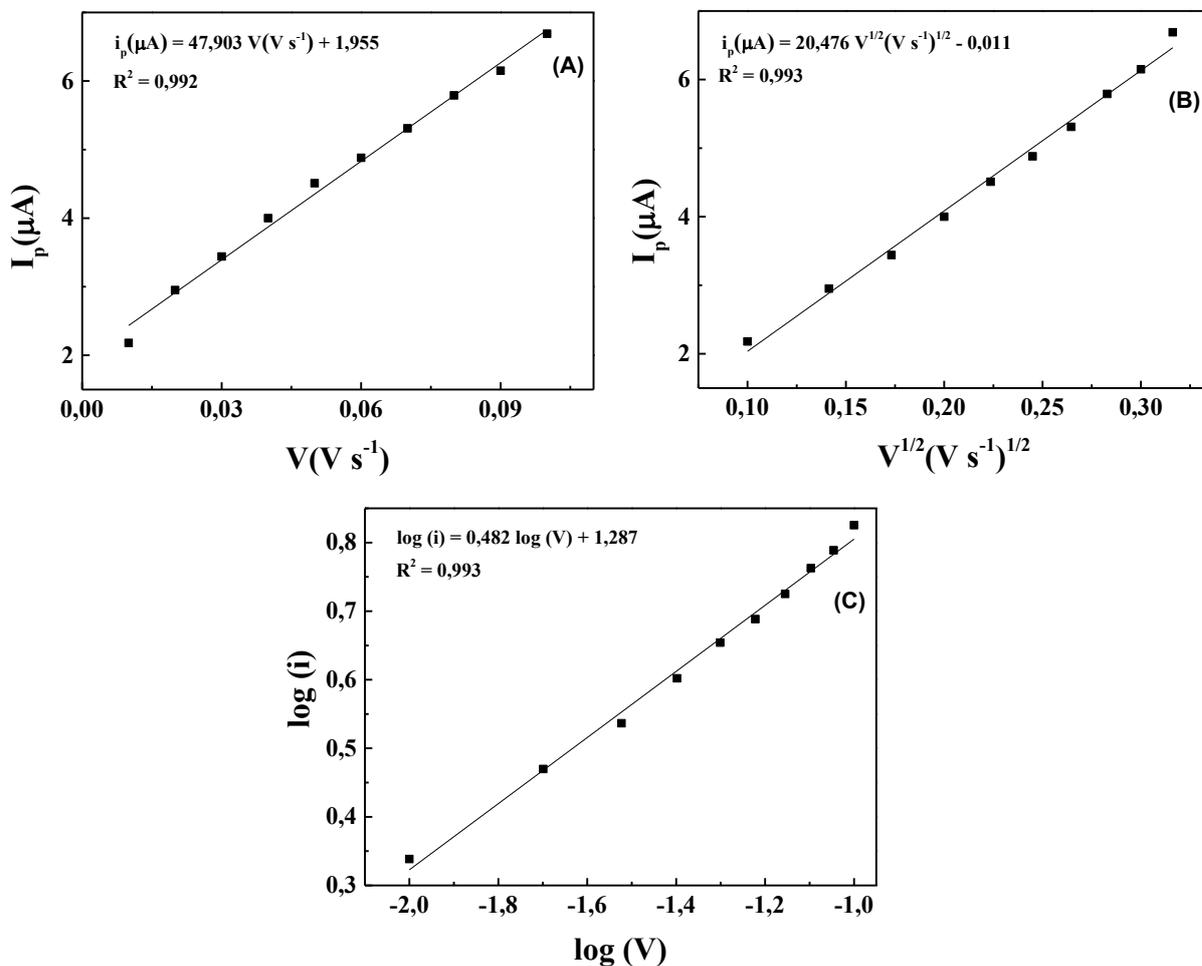


Fonte: A autora (2023).

A Figura 11 mostra, que o aumento da velocidade de varredura promoveu o deslocamento dos potenciais anódicos para valores mais positivos. Este comportamento caracteriza um sistema irreversível, pois alguns dos critérios que permitem identificar sistemas irreversíveis são: (i) ausência de pico na varredura reversa de potencial; e (ii) E_p desloca com aumento de v (BRETT; BRETT, 1994).

A relação entre a corrente de pico (I_p) e a variação da velocidade de varredura (v) permite identificar se a cinética de transferência de elétrons é ou não controlada pela difusão da espécie eletroativa. (BRETT; BRETT, 1994) (GROSSER JR, 1994). A Figura 12 apresenta a relação entre: corrente de pico e a velocidade de varredura; corrente de pico e a raiz da velocidade de varredura e o logaritmo da corrente de pico pelo logaritmo da velocidade de varredura.

Figura 12 - (A) i_p vs v ; (B) i_p vs $v^{1/2}$ e (C) $\log i_p$ vs $\log v$.



Fonte: A autora (2023).

Nota-se que a relação entre a corrente de pico de oxidação e a velocidade de varredura (Figura 12A) e a corrente de pico de oxidação em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 12B) não apresentou diferença nos valores dos coeficientes de determinação (R^2). Desta forma estes resultados não permitiram identificar o processo responsável pelo transporte do E2 para a superfície do eletrodo G/ABS.

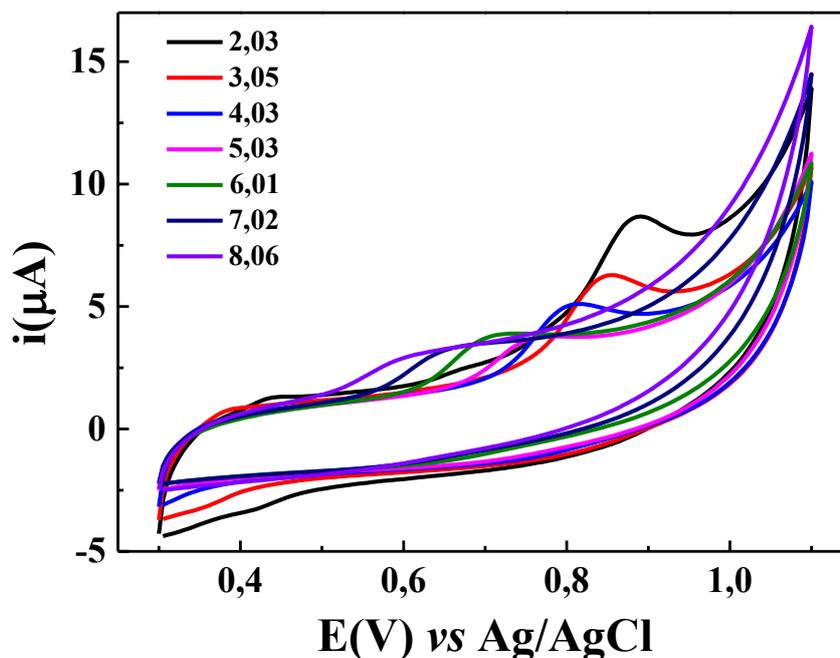
De acordo com a literatura a relação \log da corrente de pico vs \log da velocidade de varredura gera um coeficiente angular que fornece informações sobre o processo de cinética de transferência de elétrons da espécie eletroativa para a superfície do eletrodo. Coeficientes angulares com valores próximos a 0,5 caracterizam transportes de massa por difusão, enquanto valores próximos a 1,0 indicam processo de adsorção (BARD; FAULKNER; WHITE, 2022; GROSSER JR, 1994).

Analisando os resultados obtidos pela relação $\log i_p$ vs. $\log v$ para o eletrodo G/ABS (Figura 12C), o coeficiente angular de 0,482 indica que o processo de transporte de massa por difusão é responsável por transportar o E2 para a superfície do eletrodo. Este mesmo resultado foi observado no caso do E2 em eletrodo de carbono vítreo modificado com negro de fumo (CBGC) (SMAJDOR *et al.*, 2018).

5.6 ESTUDO DO pH E ELETRÓLITO DE SUPORTE

O efeito do pH na resposta voltamétrica de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de E2 no eletrodo G/ABS foi avaliado. Os voltamogramas cíclicos obtidos no tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ na faixa de pH de 2,00 a 8,00 são mostrados na Figura 13. Foram evidenciadas mudanças no comportamento voltamétrico do E2 em função do pH, com diminuição da corrente de pico e do potencial de oxidação em relação ao aumento do pH.

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) na presença de E2 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,00 a 8,00) sobre o eletrodo G/ABS. Condições experimentais: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV

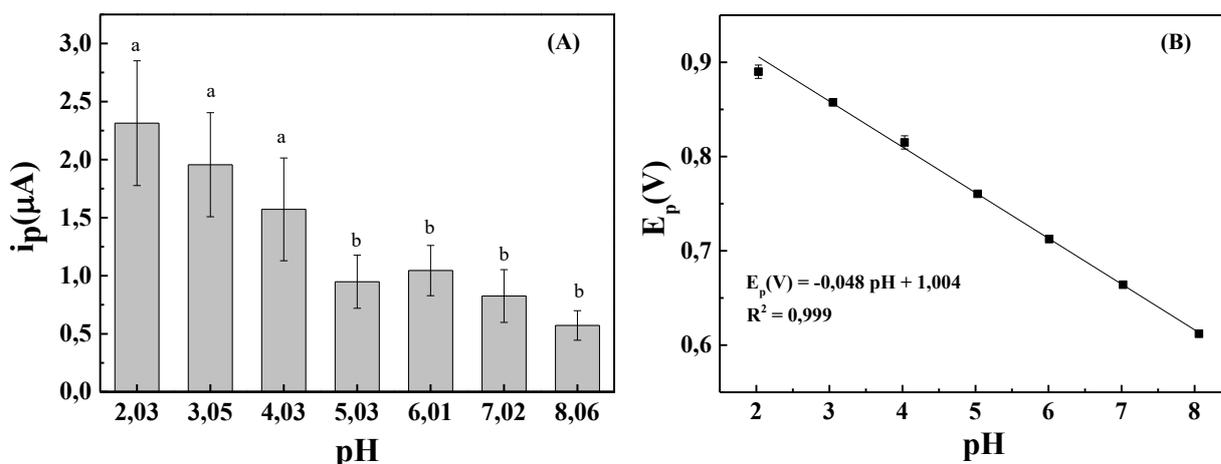


Fonte: A autora (2023).

A Figura 14A mostra as variações das correntes de pico (i_p) em função do pH. Estatisticamente, pelo teste de comparação de médias (Scott-Knott, $\alpha = 0,05$) não houve diferença na corrente de pico para pH (2,00; 3,00 e 4,00). Os demais valores de pH (5,00; 6,00; 7,00 e 8,00) avaliados apresentaram diferença estatística devido a valores menores de correntes de pico. O método de Scott-Knott consiste em testar o quão significativo é a divisão de k tratamentos em grupos que maximizem a soma de quadrados entre eles utilizando a razão de verossimilhança (OLIVEIRA; BRASÍLIA, 2017).

O pH 3,00 foi estabelecido para ensaios posteriores, pois apresentou uma resposta analítica satisfatória, e devido ao pH 2,00 apresentar um potencial de pico de oxidação para o E2 mais positivo, onde existe a ocorrência da oxidação do oxigênio da água e outras moléculas que possam estar oxidando em potenciais maiores, o que pode promover a perda de seletividade.

Figura 14 - Gráficos, por VC, de (A) i_p vs pH e (B) $E_p(V)$ vs pH. Condições experimentais: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV; tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,00 a 8,00); E2 $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$

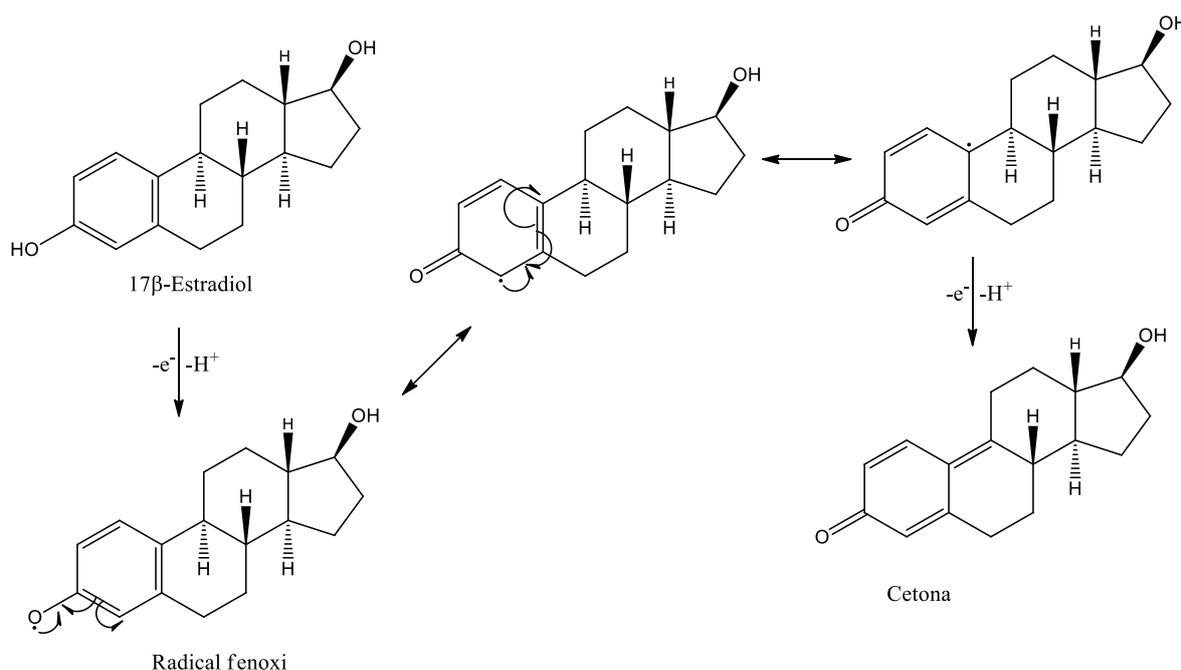


Fonte: A autora (2023).

Figura 14B mostra a variação dos potenciais de pico (E_p) em função do pH. O gráfico foi modelado por uma equação de reta, e apresentou um coeficiente de determinação de 0,999. O modelo linear também é adequado para descrever o comportamento das duas variáveis ($F_{\text{calculado}} = 1334,17 > F_{\text{tabelado}} = 4,283$ para 95% de confiabilidade). A estatística F usual, proposta por Snedcor, testa a significância de um conjunto de parâmetros de um modelo de regressão linear múltipla, quando o modelo é ajustado aos dados através do método dos mínimos quadrados (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Como observado, os potenciais de pico deslocaram para valores menos positivos com o aumento do valor de pH, indicando que a transferência eletrônica é dependente do pH do meio. O coeficiente angular do modelo obtido pode fornecer informações sobre a relação entre a quantidade de prótons e elétrons envolvidos no mecanismo eletroquímico de oxidação do E2. Conforme descrito na equação da reta (Figura 14B), para o G/ABS, o deslocamento de potencial foi de 48 mV por unidade de pH. Este valor está próximo ao valor teórico de 59 mV para processos que ocorrem com o mesmo número de elétrons e prótons (GROSSER JR, 1994) (COMPTON; BANKS, 2007), o que sugere que o processo de transferência eletrônica para reação de oxidação do E2 ocorre com números iguais de prótons e elétrons para G/ABS. O mecanismo para esta reação é proposto na Figura 15, e adaptado da literatura (NGUNDI *et al.*, 2003).

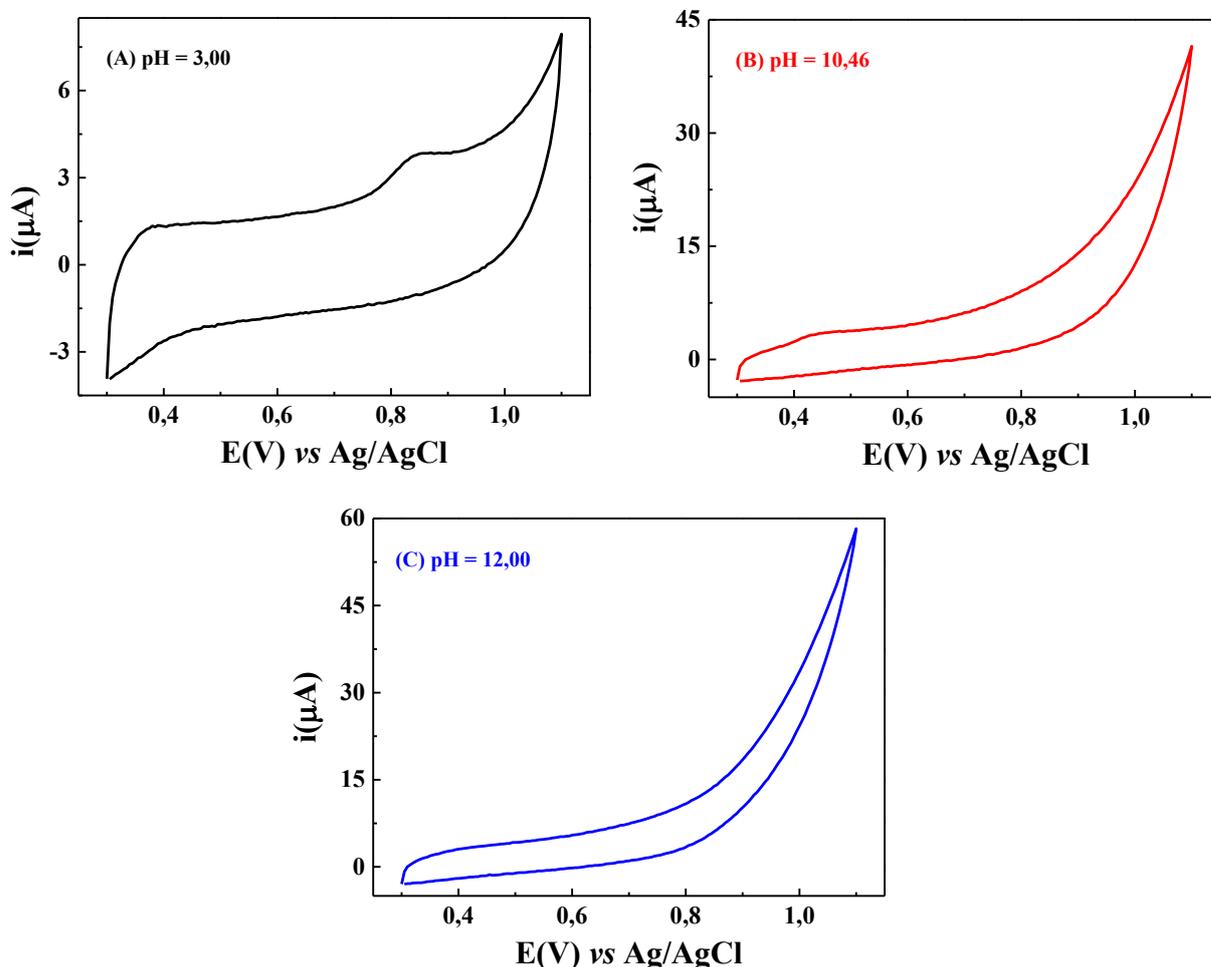
Figura 15 - Mecanismo de reação proposto para a oxidação eletroquímica do estradiol.



Fonte: Adaptado de (NGUNDI *et al.*, 2003).

A fim de confirmar a faixa de pH ideal para análise do E2 (pKa= 10,46) (PUBCHEM, 2024) e confirmar o mecanismo de reação envolvido, voltamogramas cíclicos foram obtidos para três valores de pH (3,00; 10,46 e 12,00; abaixo do pKa, no pKa e acima do pKa, respectivamente) e são apresentados na Figura 16.

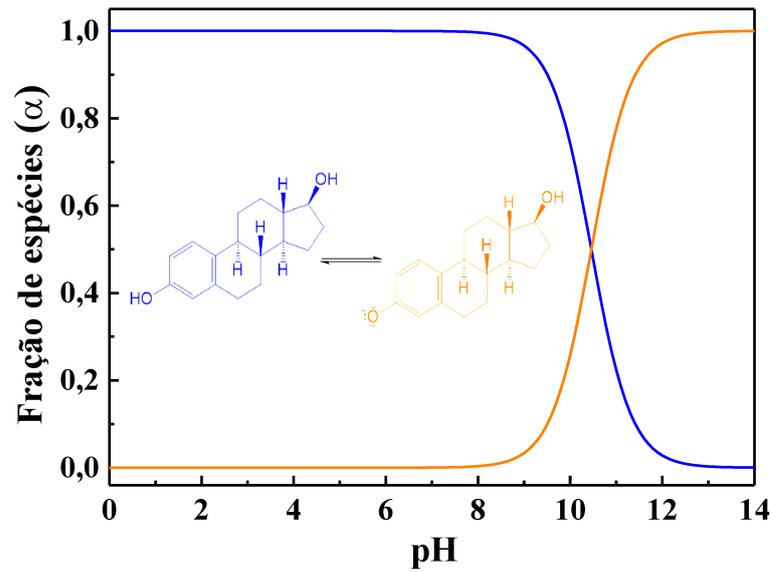
Figura 16 - Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) na presença de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs (A) pH = 3,00 (abaixo do pKa); (B) pH = 10,46 (no valor do pKa); e (C) pH = 12,00 (acima do pKa). Condições experimentais: $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; Degrau de potencial: 5 mV.



Fonte: A autora (2023).

Pode ser observado que somente no pH 3,00 (Figura 16A) evidencia-se o pico de oxidação para o E2, no potencial +0,85V. Este fato pode ser explicado pela distribuição das espécies do E2 em função do pH (Figura 17), onde verifica-se que no pH 3,00 há predominância da espécie protonada. De acordo com o mecanismo proposto na figura 15, o produto da reação é o íon fenóxido, bastante estável em meio ácido, além de em pHs mais altos ele formar dímeros, dificultando sua oxidação (SALC; BIRYOL, 2002), portanto o pico de oxidação para o E2 é da espécie protonada.

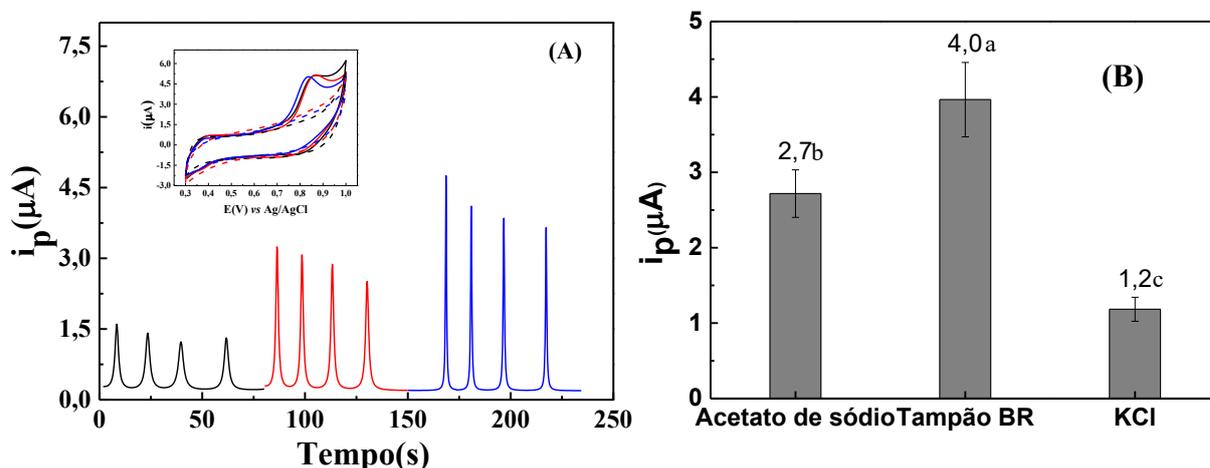
Figura 17 - Distribuição das espécies de 17 β -estradiol em função do pH.



Fonte: A autora (2023).

Com a finalidade de escolher um eletrólito mais adequado para determinação do E2, foram avaliadas as seguintes soluções no sistema BIA-AD (solução de acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹; KCl 0,5 mol L⁻¹; tampão BR 0,04 mol L⁻¹, todas em pH= 3,00) (Figura 18A). Voltamogramas cíclicos na presença de E2 50 μmol L⁻¹ para os três eletrólitos (pH 3,00) foram obtidos (Figura 18A inserção).

Figura 18 - (A) Amperogramas obtidos na presença de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos: KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (preto), Solução de Acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (vermelho) e Tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (azul). (B) Corrente de pico média como histograma com teste de comparação de médias de Scott-Knott ($p\text{-valor} = 0,05$) para os eletrólitos avaliados. Condições experimentais: pH: 3,00; Volume de injeção: $150,0 \mu\text{L}$; Vazão: $166 \mu\text{L s}^{-1}$; Potencial de trabalho: $+1,4 \text{ V}$.



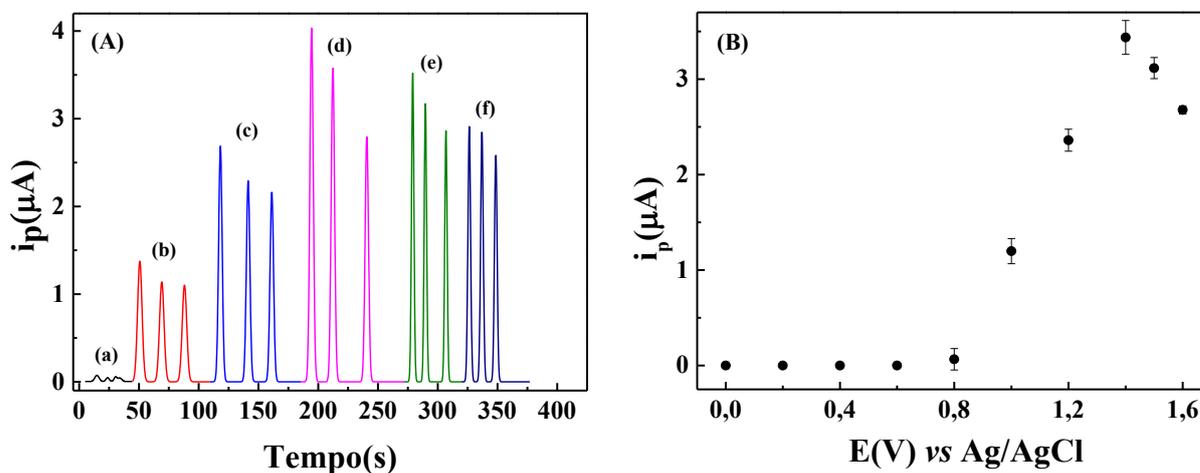
Fonte: A autora (2023).

Os voltamogramas cíclicos mostraram um deslocamento de pico no sentido positivo para o tampão BR, soluções de acetato de sódio e KCl, respectivamente. A comparação dos sinais analíticos (altura de pico no amperograma) e o resultados do teste de comparação de médias de Scott-Knott ($p\text{-valor} = 0,05$) (Figura 18B) mostraram que o tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou maior sinal analítico, assim essa solução foi escolhida como eletrólito suporte para estudos posteriores.

5.7 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA BIA-AD

Para a investigação da resposta eletroquímica do E2 no sistema BIA com detecção amperométrica, uma solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi injetada em triplicata na célula de BIA preenchida com $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR (pH 3,0), enquanto potencial constante foi aplicado no eletrodo G/ABS (0,0 a $+1,6 \text{ V}$) (Figura 19A).

Figura 19 - (A) Amperogramas obtidos para injeções em triplicata de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,00) em diferentes potenciais aplicados (a=+0,8; b=+1,0; c=+1,2; d=+1,4; e=+1,5 e f=+1,6 V). (B) Correntes de pico anódicas médias ($\pm\text{DPR}$) (n=3) injeções de solução de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema BIA (E: 0,0 a +1,6 V). Volume de injeção: $150,0 \mu\text{L}$; Vazão: $166 \mu\text{L s}^{-1}$.

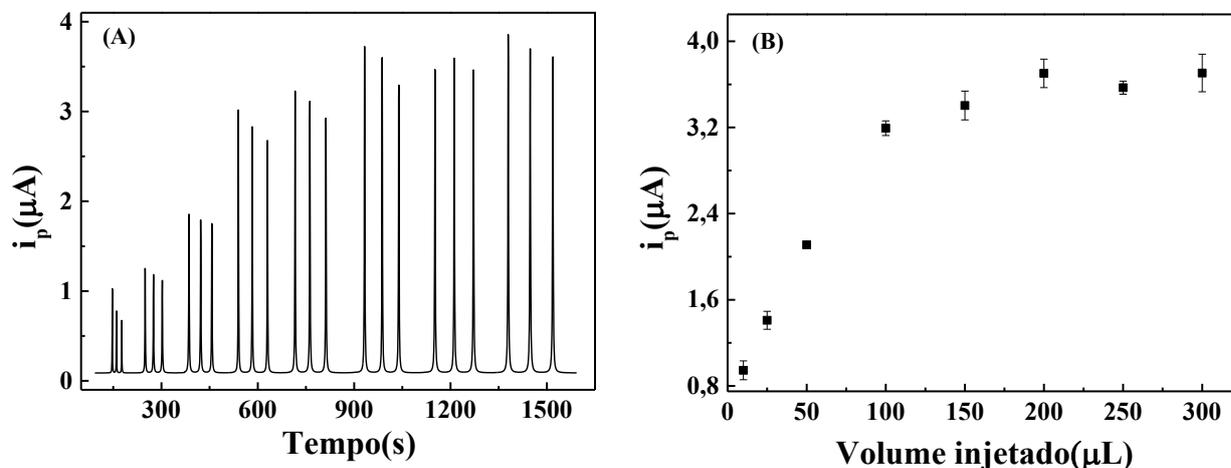


Fonte: A autora (2023).

A resposta analítica média (altura de pico no amperograma) em função dos potenciais avaliados está apresentada na Figura 19B. Não foi observada nenhuma resposta analítica em valores de potencial aplicado menores que +0,85 V pois o pico de oxidação do E2 ocorre nesse potencial (Figura 10). Para potenciais aplicados de +0,8 a +1,4V observa-se um aumento da resposta analítica, e para potenciais maiores que +1,4 verifica-se decréscimo da resposta devido ao aumento da corrente de fundo, como consequência da descarga anódica do eletrólito. Valores acima de +1,2V não foram escolhidos por serem valores muito altos de potencial, onde há bastante interferência de outras espécies que podem oxidar, desta forma, o potencial de +1,1 V foi o escolhido para estudos posteriores.

Os parâmetros de BIA (volume de injeção e vazão) foram avaliados injetando $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de E2 em triplicata (em cada condição) e usando uma agitação constante e fixada para todas as avaliações, que proporcionou uma transferência de massa mais efetiva para reestabelecimento da linha base. Volumes de injeção (10 a $300 \mu\text{L}$) foram avaliados (Figura 20). Verifica-se um aumento linear na resposta analítica até o volume de 100 microlitros e a partir desse volume a resposta de corrente fica constante e com variação mais elevada. Assim, um volume de $100,0 \mu\text{L}$ foi selecionado para utilização nos próximos experimentos.

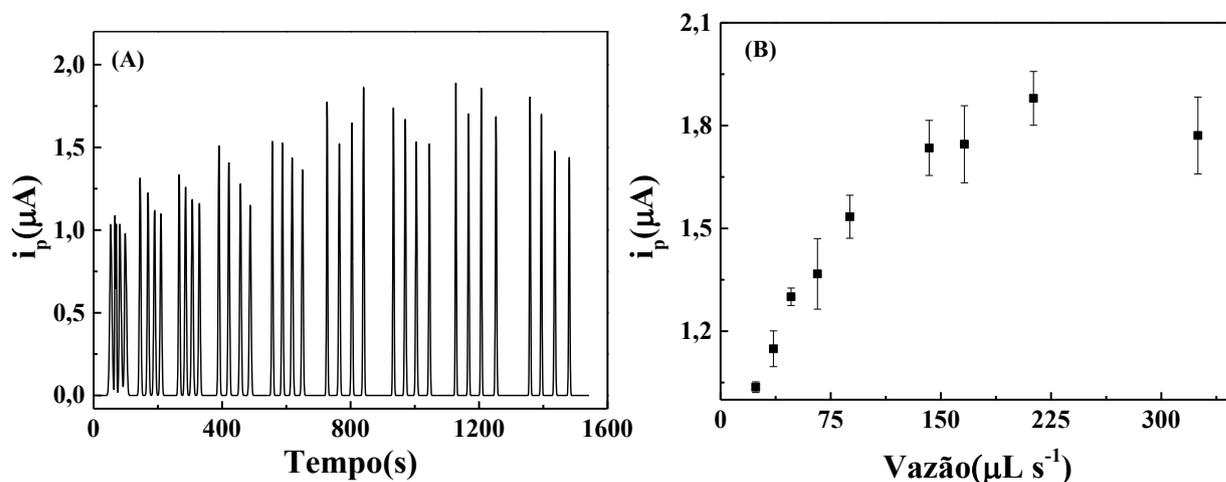
Figura 20 - (A) Amperogramas e (B) Correntes de pico anódicas médias (\pm DPR) para injeções em triplicata de solução de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema BIA variando volumes de injeção (10 - $300 \mu\text{L}$). Eletrólito: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); Potencial de trabalho: $+1,1 \text{ V}$; Vazão: $166 \mu\text{L s}^{-1}$.



Fonte: A autora (2023).

A vazão foi avaliada em todos os valores de velocidade possibilitados pela micropipeta eletrônica (24 a $325 \mu\text{L s}^{-1}$, avaliados e calculados previamente) usando uma ponteira de $1,0 \text{ mL}$, mantendo o volume de injeção de $100,0 \mu\text{L}$. Na Figura 21 observa-se que os valores de corrente de pico são proporcionais à vazão, esse comportamento e a observação de picos mais finos pode ser atribuído à diminuição da camada de difusão de Nernst e à redução da dispersão da zona de amostra sobre o G/ABS (QUINTINO; ANGNES, 2004). No entanto, desvios padrões maiores foram mais frequentes para valores de vazão acima de $142 \mu\text{L s}^{-1}$, provavelmente devido à rápida passagem do E2 sobre o G/ABS. Assim, foi usada uma vazão de $142 \mu\text{L s}^{-1}$ nos experimentos subsequentes. Todos os parâmetros otimizados estão resumidos na Tabela 3.

Figura 21 - (A) Amperogramas e (B) Correntes de pico anódicas médias (\pm DPR) para injeções em triplicata de solução de E2 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ no sistema BIA variando vazão (24 - $325 \mu\text{L s}^{-1}$). Eletrólito: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); Potencial de trabalho: $+1,1 \text{ V}$; Volume de injeção: $100,0 \mu\text{L}$.



Fonte: A autora (2023).

Tabela 3 - Parâmetros avaliados e otimizados para quantificação de E2 utilizando o G/ABS.

	Parâmetro	Faixa estudada	Valor otimizado
Condições da solução de leitura	pH	2 - 8	3,0
	Eletrólito suporte	Tampão BR, Solução Acetato e KCl	Tampão BR
	Potencial aplicado (V)	0,0 a $+1,6$	$+1,1$
Parâmetros do BIA-AD	Volume de injeção (μL)	10 - 300	100
	Vazão ($\mu\text{L s}^{-1}$)	24 - 325	142

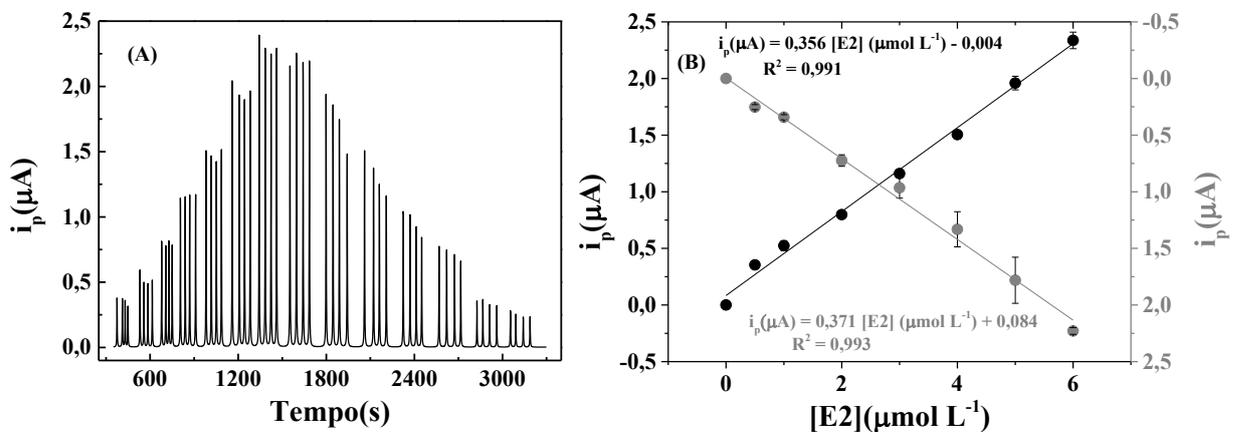
Fonte: A autora (2023).

5.8 DESEMPENHO ANALÍTICO DO G/ABS

O desempenho analítico do G/ABS foi avaliado nas condições otimizadas conforme Tabela 2, onde a resposta analítica para concentrações de E2 ($0,5$ a $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi obtida (Figura 22A). Figura 22B mostra modelo matemático linear satisfatório entre as correntes de pico (i_p) em função da concentração de E2 (aumento da concentração E2: $R^2=0,991$; $F_{\text{calculado}} =$

806,7. Diminuição da concentração E2: $R^2 = 0,993$; $F_{\text{calculado}} = 424,1$. $F_{\text{tabelado}} = 4,28$; $\alpha = 0,05$). A sensibilidade do método BIA/AD foi de $0,356$ e $0,371 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$ para aumento e diminuição de concentração, respectivamente, não apresentando efeitos de memória nesse intervalo de concentração.

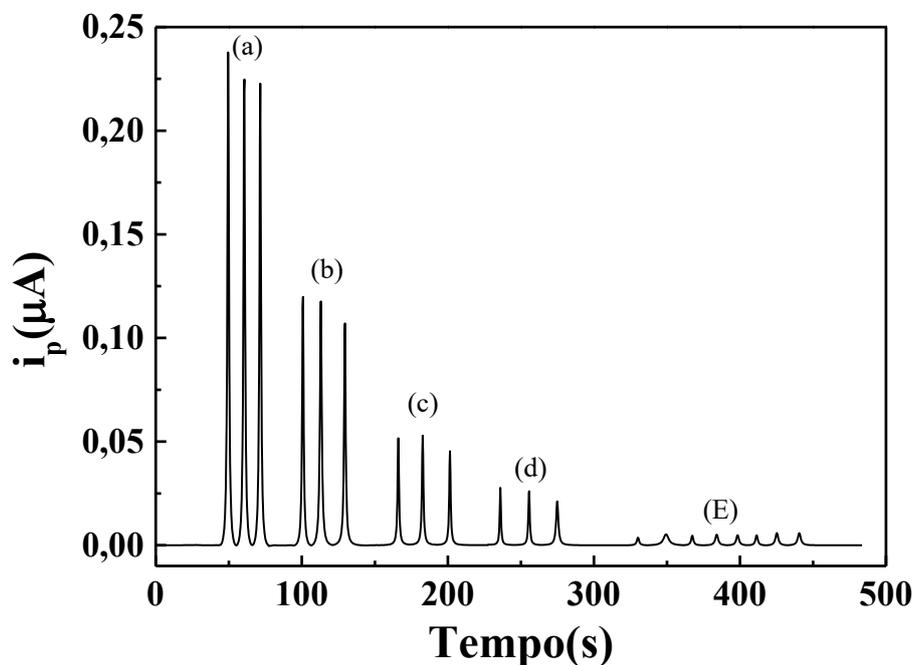
Figura 22 - (A) Respostas amperométricas para injeções em quadruplicata no sistema BIA de soluções padrão de E2 ($0,5$; $1,0$; $2,0$; $3,0$; $4,0$; $5,0$ e $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em ordem crescente e decrescente de concentração; (B) Respectivas curvas de calibração usando a corrente de pico média ($\pm\text{DPR}$) ($n=4$). Eletrólito: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0); Potencial de trabalho: $+1,1 \text{ V}$; Volume de injeção: $100,0 \mu\text{L}$; Vazão: $142 \mu\text{L s}^{-1}$



Fonte: A autora (2023).

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) reais foram obtidos pela relação sinal/ruído, através da resposta analítica de concentrações decrescentes de soluções padrões de E2 até se obter um valor de, aproximadamente, $3x$ e $10x$ o sinal da solução do branco injetada, respectivamente (Figura 23) (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Figura 23 - Amperogramas obtidos para injeções em triplicata de soluções padrão de E2 (a=1,0; b=0,5; c=0,2 e d=0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e n=8 injeções de solução do eletrólito suporte (E). Eletrólito: tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 3,00); Potencial de trabalho: +1,1 V; Volume de injeção: 100,0 μL ; Vazão: 142 $\mu\text{L s}^{-1}$.



Fonte: A autora (2023).

O LD_{real} e LQ_{real} calculados foram de 0,10 e 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, com base nos valores de corrente de pico médio dessas soluções em relação ao sinal analítico do eletrólito (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados obtidos ao reduzir gradualmente a concentração de E2 de 1,00 para 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

E2 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$I_{p\text{médio}} (\mu\text{A})(\pm\text{DPR}) (n=3)$
0,00	0,006 \pm 0,0004
0,10	0,025 \pm 0,0034
0,20	0,050 \pm 0,0040
0,50	0,115 \pm 0,0068
1,00	0,228 \pm 0,0082

Fonte: A autora (2023).

A detectabilidade do método BIA-AD também foi verificada pelas regras da IUPAC, através do método simplificado (RIBEIRO *et al.*, 2008) na qual:

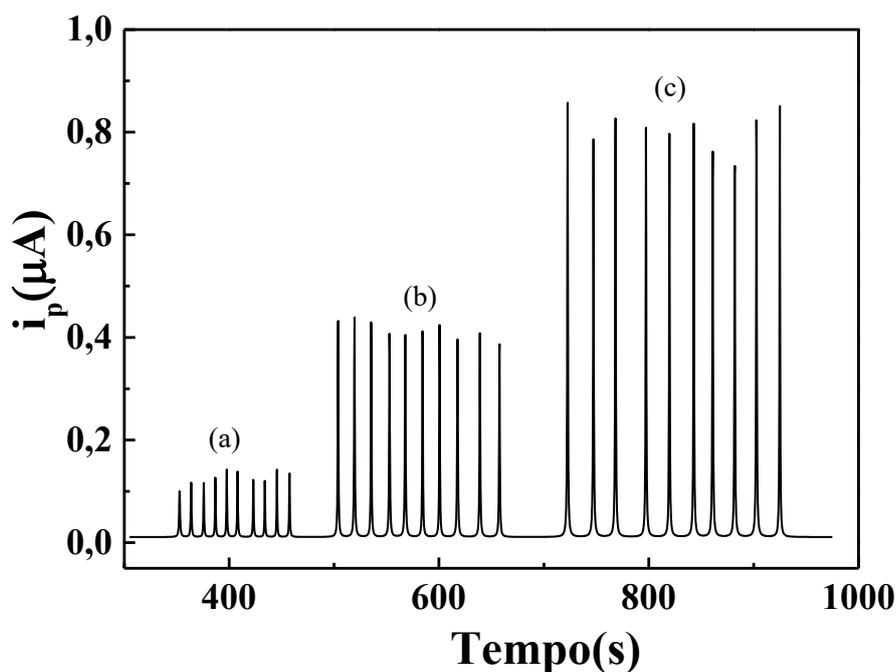
$$LD = (3x DPb)/a \quad e \quad LQ = (10x DPb)/a \quad \text{equação 02}$$

Onde: DPb= desvio padrão do branco (sinal analítico de 8 injeções eletrólito suporte (Figura 23)); a= sensibilidade (coeficiente angular da curva de calibração (Figura 22B)) (MILLER; MILLER, 2010).

Os valores de LD e LQ obtidos por esse método foram $0,009 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,029 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados demonstram que os valores obtidos por este método simplificado podem ser superestimados.

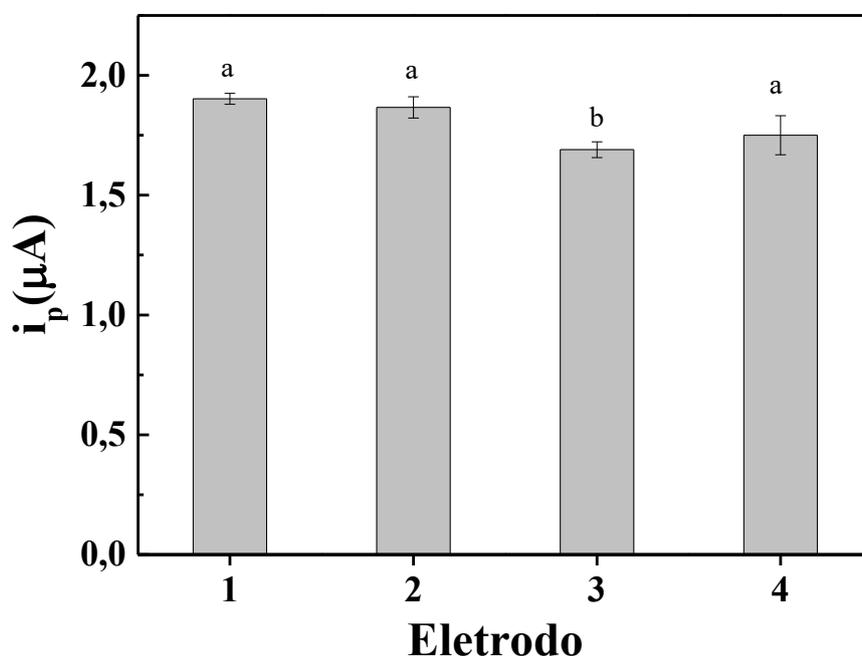
A repetibilidade do método BIA-AD foi avaliada para dez injeções sequenciais de E2 em três níveis de concentração ($0,5$; $3,0$ e $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando o mesmo eletrodo, em meio de solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH= $3,00$ (Figura 24). Os resultados revelam valores de desvio padrão relativo (RSD) satisfatórios para as concentrações analisadas, registrando-se, respectivamente, $8,6\%$, $3,2\%$ e $5,0\%$. Esses resultados demonstram a consistência e confiabilidade do método BIA-AD, reforçando a capacidade de fornecer dados precisos para a detecção do E2 para os níveis de concentração avaliados (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Figura 24 - Amperogramas obtidos no ensaio de repetibilidade, para injeções consecutivas de E2 (a= $0,5$; b= $3,0$ e c= $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) (n=10). Eletrólito: tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH $3,00$); Potencial de trabalho: $+1,1 \text{ V}$; Volume de injeção: $100,0 \mu\text{L}$; Vazão: $142 \mu\text{L s}^{-1}$.



A corrente de pico média de oxidação do E2 para 4 eletrodos (Figura 25), obtida pelo método BIA/AD, foi utilizada para avaliar a reprodutibilidade na produção dos sensores G/ABS. De acordo com o teste de Scott-Knott, dentre os 4 eletrodos avaliados, um eletrodo apresentou diferença estatística na resposta eletroquímica. A variação na produção dos sensores G/ABS dada pelo RSD, incluindo o eletrodo 3, foi de 5,5%, indicando boa reprodutibilidade no processo de fabricação dos eletrodos (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Figura 25 - Corrente de pico médias (\pm DPR) ($n=3$) como histograma com teste de comparação de médias de Scott- Knott (p -valor = 0,05) para quatro diferentes eletrodos. Condições experimentais: $[E2] = 1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 3,00$.



Fonte: A autora (2023).

A Tabela 5 apresenta as características analíticas do G/ABS otimizado para a determinação de E2 por BIA-AD. Os resultados evidenciam boa detectabilidade, com destaque para a alta sensibilidade e linearidade. O método proposto demonstrou ser promissor para futuras análises de E2 em amostras reais.

Tabela 5 - Características analíticas para BIA-AD com G/ABS na determinação de E2 nas condições otimizadas.

Parâmetros analíticos		
Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	0,356	
LD_{real} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,10	
$\text{LD}_{\text{teórico}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,009	
LQ_{Real} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,20	
$\text{LQ}_{\text{teórico}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,029	
R^2	0,991	
Repetibilidade (% RSD; n = 10)	[E2] = 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	8,6
	[E2] = 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,2
	[E2] = 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	5,0
Reprodutibilidade intercompósito (%RSD; n=4/eletrodos)	5,5	

Fonte: A autora (2023).

A Tabela 6 compara as principais características analíticas do sensor G/ABS e sensores da literatura para a determinação de E2.

Tabela 6 - Comparação do método proposto (BIA-AD com G/ABS) com outros métodos para determinação de E2 reportados na literatura.

Técnica (eletrodo)	LD ¹ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LR ² ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
DPV ³ (GCE)	12,1	40,12 – 1003,6	(SALC; BIRYOL, 2002)
DPV (GCE/GQDs/PSSA)	0,0002	0,001 – 6,0	(ARVAND; HEMMATI, 2017)
DPV (CuPc-P6LC-Nafion/SPEF)	0,005	0,08 – 7,3	(WONG et al., 2019)
ASV ⁴ (CBGC)	0,092	0,15 – 3,5	(SMAJDOR <i>et al.</i> , 2018)
DPV (CPE/GNR-FS-Au-CA)	0,007	0,1 – 4,99	(ÖZCAN; TOPÇUOĞULLARI, 2017)
SWV ⁵ (CPE)	0,08	0,22 – 11,00	(ALVES; FIORUCCI; ARRUDA, 2019)
BIA-AD ⁶ (G/ABS)	0,009	0,029 – 6,0	Este trabalho

¹Limite de detecção teórico; ²Faixa linear (*Linear range*); ³Voltametria de pulso diferencial (*Differential Pulse Voltammetry*); ⁴Voltametria de Redissolução Anódica (*Anodic stripping voltammetry*); ⁵Voltametria de Onda Quadrada (*Square Wave Voltammetry*). **Eletrodos de trabalho:** Eletrodo de carbono vítreo (GCE); Eletrodo de carbono vítreo com pontos quânticos de grafeno dopado com ácido poli-sulfosalicílico (GCE/GQDs/PSSA); Eletrodo descartável serigrafado feito de tinta de carbono modificada com CuPc, P6LC e película de Nafion (CuPc-P6LC-Nafion/SPEF); Eletrodo de carbono vítreo modificado com negro de fumo (CBGC); Eletrodo de pasta de carbono com nanopartículas de ouro modificado com sílica pirogênica decorada com nanofibras de grafeno e auto-organizado com cisteamina (CPE/GNR-FS-Au-CA); Eletrodo de pasta de carbono (CPE).

Fonte: A autora (2023).

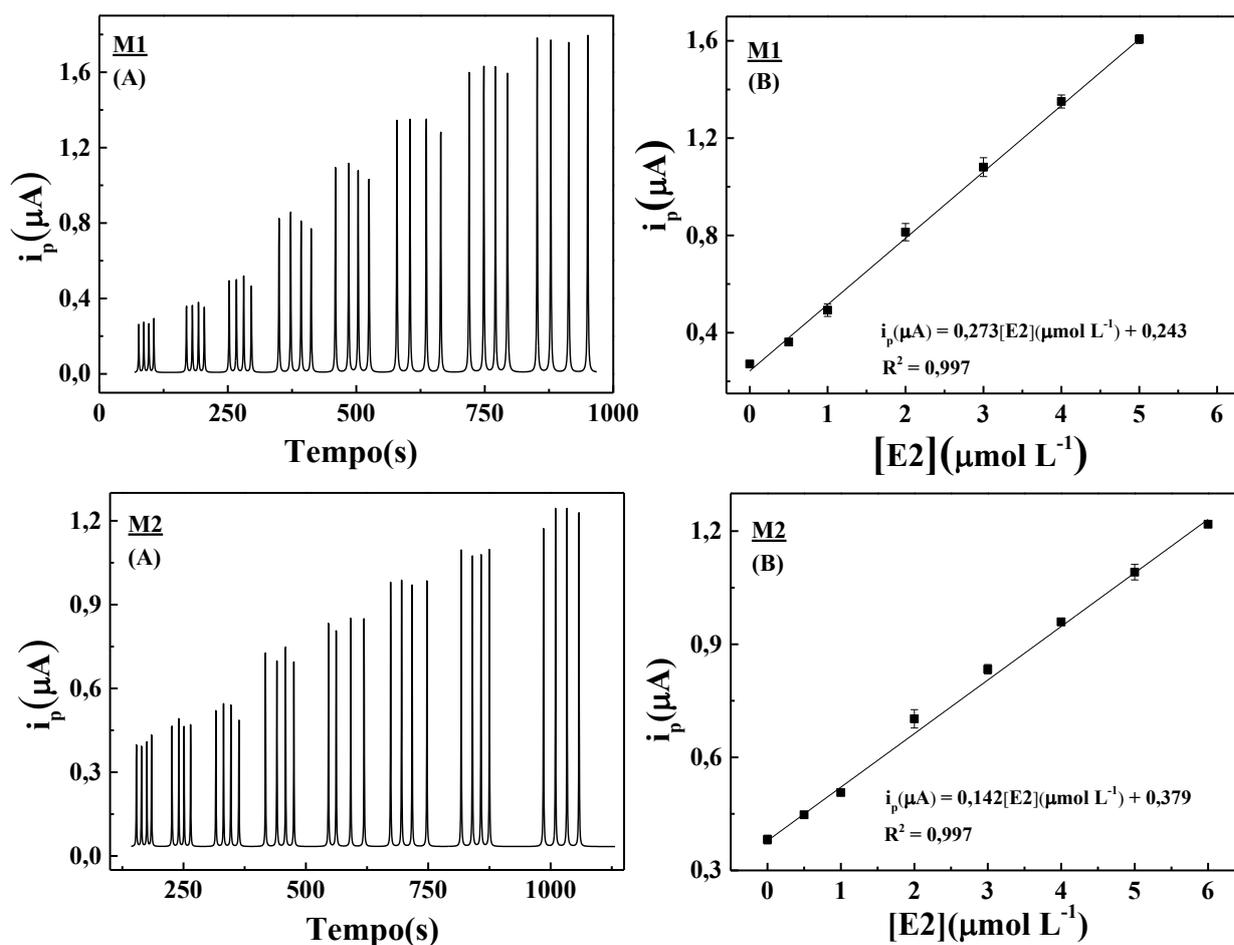
Os valores de LD obtidos com o G/ABS foram próximos aos valores da maioria dos sensores descritos na literatura, cujos custos de fabricação são mais elevados que o G/ABS, devido a utilização de modificadores tais como: nano partículas de ouro, e com procedimento de fabricação mais complexos. O procedimento de fabricação do eletrodo G/ABS é rápido e simplificado, ao contrário de outros eletrodos modificados da literatura que requerem etapas mais complexas, além do que o eletrodo G/ABS não requer ativação da superfície, apenas uma etapa de lixamento. Ademais, o compósito pode ser utilizado para revestir diferentes formatos de substratos de ABS (impressos em 3D) promovendo uma diversidade de dispositivos

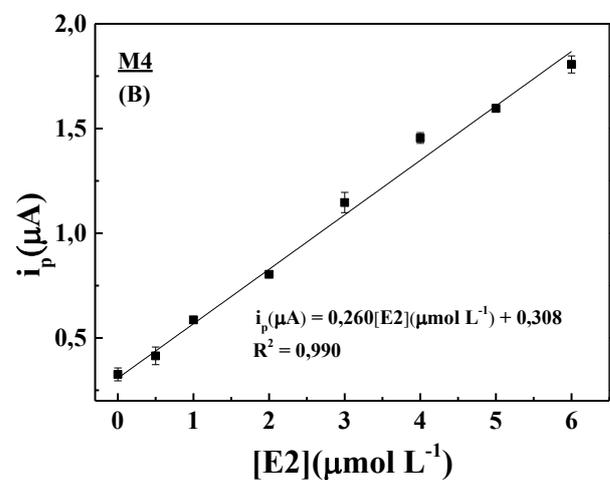
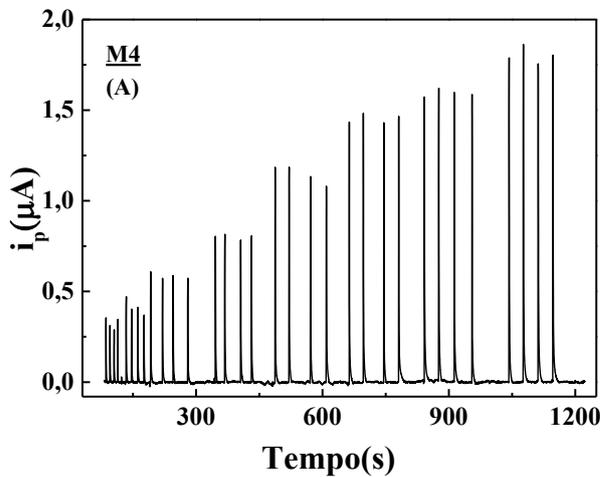
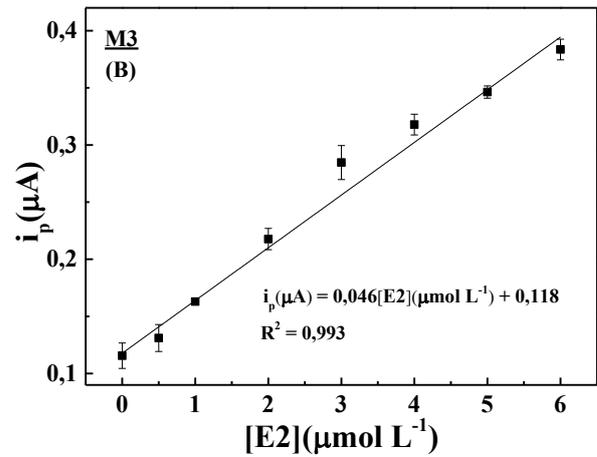
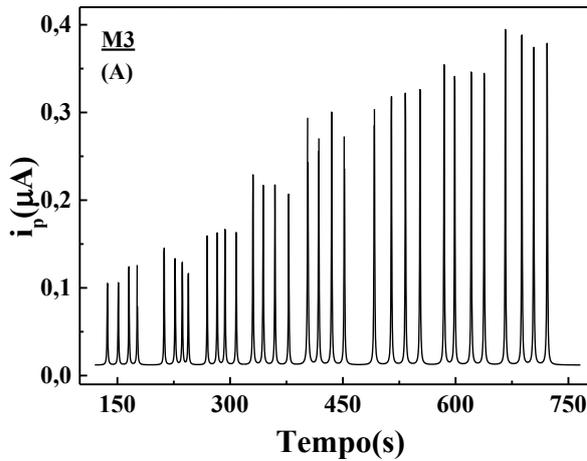
analíticos que podem ser fabricados, além de facilitar a incorporação de outros modificadores junto ao pó de grafite.

5.9 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

No sentido de avaliar o efeito matriz na determinação do E2 nas amostras de água foram obtidas curvas de adição de padrão para as amostras (M1, M2, M3 e M4) (Figura 26).

Figura 26 - (A) Respostas amperométricas para injeções em quadruplicata no sistema BIA das amostras de água (M1, M2, M3 e M4) e de soluções de cada amostra adicionada com padrões de E2 nas concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Respective curva de calibração por adição de padrão usando a corrente de pico média ($\pm\text{DPR}$) ($n=4$). Eletrólito: tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 3,00); Potencial de trabalho: +1,1 V; Volume de injeção: 100,0 μL ; Vazão: 142 $\mu\text{L s}^{-1}$.





Fonte: A autora (2023).

A porcentagem do efeito matriz foi calculada de acordo com a equação seguinte:

$$\text{EM}(\%) = \frac{S_{\text{AP}}}{S_{\text{PE}}} - 1 \times 100$$

equação 03

Onde: EM: efeito matriz (%); S_{AP} : Sensibilidade da curva de calibração por adição padrão; S_{PE} : Sensibilidade da curva de calibração por padrão externo.

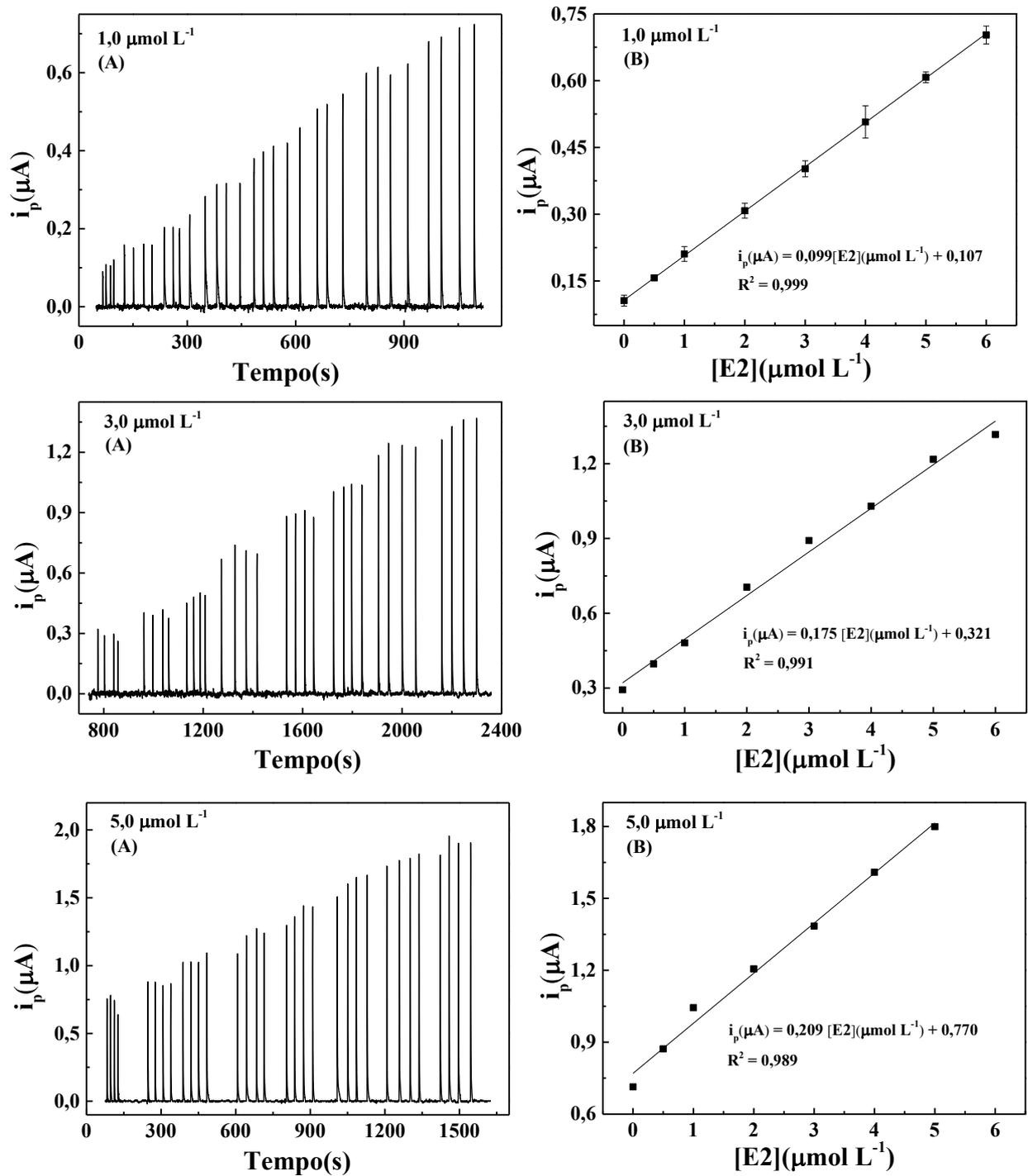
O efeito de matriz de cada amostra pode ser expresso como porcentagem de aumento (>0%) ou supressão (<0%). Quanto mais a porcentagem se afastar de zero (0%), maior é o efeito de matriz. O EM é tipicamente classificado como “suave” para valores entre -20% e 20%, “médio” quando se situa entre -50% a -20% ou 20% a 50%, e “forte” quando se situa abaixo de -50% ou acima de 50% (KIM *et al.*, 2023; SHIN *et al.*, 2019). Neste estudo observou-se EM

“médio” para as amostras M1 e M4 (-23,31% e -26,97%, respectivamente), e EM “forte” para as amostras M2 e M3(-60,11% e -87,08%, respectivamente). Isso indica que a matriz das amostras de água tem um impacto na sensibilidade do método, resultando em menores valores de inclinação da curva analítica por adição padrão ($S= 0,273; 0,142; 0,046$ e $0,260 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) em comparação com a curva de calibração por padrões externos ($S= 0,356 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$). Este resultado confirma a influência da matriz de amostra na resposta analítica, portanto é necessário aplicar a curva de calibração por adição de padrão para quantificação correta de E2 nas amostras.

Utilizando as equações de reta (Figuras 26B), fazendo $y = 0$ ($i_p(\mu\text{A}) = 0$), foi possível calcular as concentrações de E2 para cada amostra diluída, e após aplicação do fator de correção, foi possível chegar aos valores de concentração de E2 para cada amostra: ($M1 = 2,23 \mu\text{mol L}^{-1}$; $M2 = 6,66 \mu\text{mol L}^{-1}$; $M3 = 63,84 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $M4 = 11,84 \mu\text{mol L}^{-1}$). No Brasil não há uma legislação sobre limites de estrogênios em águas, o que se tem é a PL 4541/2020 que “Dispõe sobre o controle da concentração de estrogênio nos efluentes das estações de tratamento de esgoto e na água de abastecimento público”, de autoria da deputada Paula Belmonte, em tramitação na Câmara dos Deputados, aguardando Parecer do Relator na Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (CMADS) (PORTAL DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2020).

Objetivando avaliar a exatidão do método, curvas de adição de padrão para a amostra a amostra de água M1 fortificada com E2 em três níveis de concentração ($1,0; 3,0$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram obtidas (Figura 27) e os resultados de recuperação constam na Tabela 7.

Figura 27 - (A) Respostas amperométricas para injeções em quadruplicata no sistema BIA das seguintes concentrações do padrão E2 adicionado (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para amostras de água fortificadas com padrão de E2 em três níveis de concentração (1,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) respectivas curvas de calibração por adição de padrão usando a corrente de pico média ($\pm\text{DPR}$) ($n=4$).



Fonte: A autora (2023).

Tabela 7 - Valores de recuperação obtidos por análise em BIA-AD com G/ABS após dopagem da amostra M1 com padrões de E2 (1,0, 3,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Amostra	[E2] sem fortificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[E2] fortificada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[E2] encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
M1	2,21	1,0	2,68	84
	2,16	3,0	4,59	89
	2,12	5,0	9,22	129

Fonte: A autora (2023).

Os resultados obtidos, conforme mostrados na Tabela 7, revelam que os valores de recuperação na amostra fortificada variaram de 84% a 129%. Esses resultados destacam a boa exatidão do método BIA-AD, demonstrando sua confiabilidade e reforçam sua aplicabilidade em amostras de água (RIBEIRO *et al.*, 2008).

6 CONCLUSÃO

O método BIA-AD utilizando o eletrodo de grafite/acrilonitrila butadieno estireno (G/ABS) foi eficiente para quantificação do hormônio 17β -estradiol em amostras de água de rio. Ao otimizar as condições experimentais, resultados adequados para determinação de E2 foram alcançados, com limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), comparáveis com os dados previamente relatados na literatura científica. Além disso, a precisão do método foi comprovada pelos valores de repetibilidade e reprodutibilidade obtidos. Os testes de adição de padrão e recuperação após fortificação nas amostras de água comprovaram a exatidão do método. O G/ABS também se destacou por sua ampla faixa linear de resposta, tornando-o uma ferramenta versátil para a análise das amostras de forma confiável e precisa.

Os resultados demonstram a viabilidade do método BIA-AD, rápido e portátil, capaz de quantificar níveis traços de hormônios, e a aplicação bem-sucedida do G/ABS representa um avanço significativo na área ambiental, que abre porta à criação de soluções eficazes para o monitoramento e o controle de hormônios no ambiente aquático, contribuindo assim para a proteção da qualidade da saúde pública.

A não modificação química do sensor G/ABS e a ausência de ativação de superfície facilita e viabiliza a fabricação do compósito e a produção do eletrodo. A possibilidade de revestimento de outros formatos de substratos de ABS podem promover o desenvolvimento de uma diversidade de dispositivos analíticos, além de possibilitar a incorporação de outros modificadores junto ao compósito. Estas características demonstram as vantagens na utilização do sensor e perspectivas para próximos trabalhos.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo.

Técnico de Laboratório, carga horária: 40 h. semanais

PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS

NOVAIS, AUGUSTO DOS SANTOS; **RIBEIRO, DAIANE GABRIELA**; MELO, LARISSA MAGALHÃES DE ALMEIDA; FERRARI JÚNIOR, ETTORE; ARANTES, LUCIANO CHAVES; LUCCA, BRUNO GABRIEL; DE MELO, EDMAR ISAIAS; BROSCENCHI, RICARDO FRANCISCO; DOS SANTOS, WALLANS TORRES PIO; DA SILVA, RODRIGO AMORIM BEZERRA. Simple, Miniaturized, Adaptable, Robust and Transportable (SMART) 3D-printed electrochemical cell: A friendly tool for on-site and forensic analysis. SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, v. 398, p. 134667, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2023.134667>.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

RIBEIRO, D. G.; DE MELO, EDMAR ISAIAS; DA SILVA, RODRIGO AMORIM BEZERRA. Determinação de 17beta-estradiol com eletrodo de grafite-ABS em sistema BIA com detecção amperométrica. 2023. In: 8ª Semana da Química e 10º Workshop da Pós-graduação em Química da UFU, 2023, Uberlândia-MG.

NOVAIS, A. S.; OLIVEIRA, F. M.; **RIBEIRO, DAIANE GABRIELA**; DE ALMEIDA MELO, LARISSA MAGALHÃES; FERRARI JUNIOR, E.; ARANTES, LUCIANO C.; LUCCA, B. G.; SANTOS, W. T. P.; MELO, E. I.; BROSCENCHI, R. F.; SILVA, R. A. B.. SMART-EC3D: Uma célula eletroquímica impressa em 3D Simples, Miniaturizada, Adaptável, Robusta e Transportável. In: XXIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2023, Porto Alegre-RS.

Manuela Zarpelão Agassi; Felipe Fernandes Morotti; **Daiane Gabriela Ribeiro**; Fabiano Mendonça de Oliveira; Edmar Isaias de Melo. Dispositivo eletroanalítico impresso em 3D microfluídico baseado em fio de algodão para análise de paracetamol em formulações farmacêuticas. In: III Seminário de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação e 20ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da UFU, 2023, Uberlândia-MG.

Felipe Fernandes Morotti; Manuela Zarpelão Agassi; **Daiane Gabriela Ribeiro**; Fabiano Mendonça de Oliveira; Edmar Isaias de Melo. Dispositivo eletroanalítico impresso em 3D microfluídico baseado em fio de algodão para análise de íons ferroso em formulações farmacêuticas. In: III Seminário de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação e 20ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da UFU, 2023, Uberlândia-MG.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

NOVAIS, A. S.; OLIVEIRA, F. M.; **RIBEIRO, DAIANE GABRIELA**; DE ALMEIDA MELO, LARISSA MAGALHÃES; FERRARI JUNIOR, E.; ARANTES, LUCIANO C.; LUCCA, B. G.; SANTOS, W. T. P.; MELO, E. I.; BROCENSCHI, R. F.; SILVA, R. A. B. SMART-EC3D: Uma célula eletroquímica impressa em 3D Simples, Miniaturizada, Adaptável, Robusta e Transportável. In: XXIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2023, Porto Alegre-RS. resumos do SIBEE, 2023.

8 REFERÊNCIAS

- ALAM, S. N.; SHARMA, N.; KUMAR, L. Synthesis of Graphene Oxide (GO) by Modified Hummers Method and Its Thermal Reduction to Obtain Reduced Graphene Oxide (rGO)*. *Graphene*, v. 06, n. 01, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/graphene.2017.61001>
- ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. *Revista Chemkeys*, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.20396/chemkeys.v0i3.9609>
- ALVES, T. S.; FIORUCCI, A. R.; ARRUDA, G. J. Development of an electrochemical methodology for the quantification of β -estradiol in pharmaceutical formulation. *Orbital*, v. 11, n. 4 Special Issue, p. 277–283, 2019. <https://doi.org/10.17807/orbital.v11i4.1332>
- APHA, AWWA, W. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. Washington: American Public Health Association, 2012.
- ARANTES, I. V. S.; CRAPNELL, R. D.; WHITTINGHAM, M. J.; SIGLEY, E.; PAIXÃO, T. R. L. C.; BANKS, C. E. Additive Manufacturing of a Portable Electrochemical Sensor with a Recycled Conductive Filament for the Detection of Atropine in Spiked Drink Samples. *ACS Applied Engineering Materials*, v. 1, n. 9, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsaenm.3c00345>
- 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, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.083>
- ASADIAN, E.; GHALKHANI, M.; SHAHROKHIAN, S. Electrochemical sensing based on carbon nanoparticles: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 293, p. 183–209, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2019.04.075>.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; WHITE, H. S. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2022.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. *Electrochemistry. Principles, methods and applications*. *Electrochimica Acta*, v. 39, n. 6, p. 853, 1994. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(94\)80035-9](https://doi.org/10.1016/0013-4686(94)80035-9)
- BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1931. <https://doi.org/10.1039/jr9310001456>
- CARDOSO, R. M.; KALINKE, C.; ROCHA, R. G.; DOS SANTOS, P. L.; ROCHA, D. P.; OLIVEIRA, P. R.; JANEGITZ, B. C.; BONACIN, J. A.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1118, p. 73–91, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.03.028>.
- CARON, E.; SHEEDY, C.; FARENHORST, A. Development of competitive ELISAs for 17β -estradiol and 17β -estradiol +estrone+using rabbit polyclonal antibodies. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 45, n. 2, 2010. <https://doi.org/10.1080/03601230903472090>
- CASTRO, S. V. F.; ROCHA, R. G.; JOÃO, A. F.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Promising Applications of Additive-Manufactured (3D-printed) Electrochemical Sensors for Forensic Chemistry. *Visao Fokka Communication Agency*, 2022. <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.RV-50-2021>
- COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. Understanding voltammetry. <https://doi.org/10.1142/6430>

- DE MORAES, N. C.; CARVALHO, R. M.; FERREIRA, V. S.; DA SILVA, R. A. B.; DE MELO, E. I.; PETRONI, J. M.; LUCCA, B. G. Improving the performance and versatility of microfluidic thread electroanalytical devices by automated injection with electronic pipettes: a new and powerful 3D-printed analytical platform. *Microchimica Acta*, v. 190, n. 12, p. 461, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-06026-0>
- DE OLIVEIRA, F. M.; DE MELO, E. I.; DA SILVA, R. A. B. 3D Pen: A low-cost and portable tool for manufacture of 3D-printed sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 321, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128528>
- DE OLIVEIRA, F. M.; DE MELO, E. I.; DA SILVA, R. A. B. A versatile user-friendly electrochemical cell with three 3D-pen-printed electrodes in a tiny micropipette tip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 360, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131650>
- DE RESENDE, M. A. C.; DA SILVA, D. N.; PEREIRA, A. C. Flow and batch injection systems with electrochemical detection applied in drugs determination. *Revista Virtual de Quimica*, v. 12, n. 5, p. 1186–1209, 2020. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200095>
- DEFFO, G.; TONLEU TEMGOUA, R. C.; FOUKMENIOK MBOKOU, S.; NJANJA, E.; KENFACK TONLÉ, I.; NGAMENI, E. A sensitive voltammetric analysis and detection of Alizarin Red S onto a glassy carbon electrode modified by an organosmectite. *Sensors International*, v. 2, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100126>
- DES AZEVEDO, S.; LAKSHMI, D.; CHIANELLA, I.; WHITCOMBE, M. J.; KARIM, K.; IVANOVA-MITSEVA, P. K.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Molecularly imprinted polymer-hybrid electrochemical sensor for the detection of β -estradiol. In: 2013, *Industrial and Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/ie302999j>
- DI-OLIVEIRA, M.; ROCHA, R. G.; DE FARIA, L. V.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Carbon-Black Integrated Polylactic Acid Electrochemical Sensor for Chloramphenicol Determination in Milk and Water Samples. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 169, n. 4, 2022. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac6454>
- DONG, X.; HE, L.; LIU, Y.; PIAO, Y. Preparation of highly conductive biochar nanoparticles for rapid and sensitive detection of 17β -estradiol in water. *Electrochimica Acta*, v. 292, p. 55–62, 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.09.129>
- FONSECA, I.; PROENÇA, L.; CAPELO, S. A VOLTAMETRIA CÍCLICA E DE VARRIMENTO LINEAR UNIDIRECIONAL: SUAS POTENCIALIDADES NA CARATERIZAÇÃO DE PROCESSOS DE CORROSÃO. *Corros. Prot. Mater*, v. 34, n. 1, 2015.
- GROSSER JR, D. K. Electrochemical modeling -- Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 15, p. 792A-793A, 1994.
- 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, 2011. <https://doi.org/10.1080/17458081003752988>
- HARRIS, D. *Explorando a Química Analítica*. 4. ed. ed. Rio de Janeiro, 2016.
- JOÃO, A. F.; CASTRO, S. V. F.; CARDOSO, R. M.; GAMELA, R. R.; ROCHA, D. P.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. 3D printing pen using conductive filaments to fabricate affordable electrochemical sensors for trace metal monitoring. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 876, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114701>
- JOÃO, A. F.; ROCHA, R. G.; MATIAS, T. A.; RICHTER, E. M.; FLÁVIO S. PETRUCI, J.; MUÑOZ, R. A. A. 3D-printing in forensic electrochemistry: Atropine determination in

beverages using an additively manufactured graphene-polylactic acid electrode. *Microchemical Journal*, v. 167, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106324>

KANSO, H.; INGUIMBERT, N.; ISTAMBOULIE, G.; BARTHELMEBS, L.; CALAS-BLANCHARD, C.; NOGUER, T. Chemiluminescence immunoassays for estradiol and ethinylestradiol based on new biotinylated estrogen derivatives. *Analytical Biochemistry*, v. 537, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.08.023>

KIM, S. H.; LEE, Y. H.; JEONG, M. J.; GWON, D. Y.; LEE, J. H.; SHIN, Y.; CHOI, H. LC-MS/MS Method Minimizing Matrix Effect for the Analysis of Bifenthrin and Butachlor in Chinese Chives and Its Application for Residual Study. *Foods*, v. 12, n. 8, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12081683>

KONOPKA, S. J.; MCDUFFIE, B. Diffusion Coefficients of Ferri- and Ferrocyanide Ions in Aqueous Media, Using Twin-Electrode Thin-Layer Electrochemistry. *Analytical Chemistry*, v. 42, n. 14, 1970. <https://doi.org/10.1021/ac50160a042>

LAHCEN, A. A.; BALEG, A. A.; BAKER, P.; IWUOHA, E.; AMINE, A. Synthesis and electrochemical characterization of nanostructured magnetic molecularly imprinted polymers for 17- β -Estradiol determination. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 241, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.132>

LOPES, C. E. C.; DE FARIA, L. V.; ARAÚJO, D. A. G.; RICHTER, E. M.; PAIXÃO, T. R. L. C.; DANTAS, L. M. F.; MUÑOZ, R. A. A.; DA SILVA, I. S. Lab-made 3D-printed electrochemical sensors for tetracycline determination. *Talanta*, v. 259, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124536>

MILLER, J. N.; MILLER, J. M. *Statistics and Chemistry for Analytical Chemometrics*.

MORAES, F. C.; ROSSI, B.; DONATONI, M. C.; DE OLIVEIRA, K. T.; PEREIRA, E. C. Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. *Analytica Chimica Acta*, v. 881, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.043>

NGUNDI, M. M.; SADIK, O. A.; YAMAGUCHI, T.; SUYE, S. First comparative reaction mechanisms of β -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. *Electrochemistry Communications*, v. 5, n. 1, p. 61–67, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(02\)00538-6](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(02)00538-6)

NOVAIS, A. dos S.; RIBEIRO, D. G.; MELO, L. M. de A.; FERRARI JÚNIOR, E.; ARANTES, L. C.; LUCCA, B. G.; DE MELO, E. I.; BROSCENCHI, R. F.; DOS SANTOS, W. T. P.; DA SILVA, R. A. B. Simple, Miniaturized, Adaptable, Robust and Transportable (SMART) 3D-printed electrochemical cell: A friendly tool for on-site and forensic analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 398, p. 134667, 2024. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134667>

NUNES, C. N.; PAULUK, L. E.; FELSNER, M. L.; EGÉA DOS ANJOS, V.; QUINÁIA, S. P. Rapid Screening Method for Detecting Ethinyl Estradiol in Natural Water Employing Voltammetry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3217080>

OLDHAM, K. B. Analytical expressions for the reversible Randles-Sevcik function. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 105, n. 2, 1979. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(79\)80132-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)80132-1)

OLIVEIRA, M. de; POLETTO, M.; SEVERO, T. C. Rota Química para Produção de Óxido de Grafeno a Partir de Oxidação do Grafite Comercial. *rica - Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada*, v. 3, 2018.

OLIVEIRA, F. Microdispositivos eletroquímicos confeccionados com caneta 3D e outros instrumentos portáteis e acessíveis para a análise de contaminantes ambientais. 2023. - Universidade Federal de Uberlândia, 2023. <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.665>

OLIVEIRA, N.; BRASÍLIA, P. Aplicação do Método Scott-Knott em Estudo de Brusone no Trigo.

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, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.131>

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; DE ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltammetry: A brief review about concepts. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>

PATEL, S.; HOMAEI, A.; RAJU, A. B.; MEHER, B. R. Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. Elsevier Masson SAS, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.078>

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. *Electroanalysis*, v. 8, n. 7, 1996 a. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080713>

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. *Electroanalysis*, v. 8, n. 7, 1996 b. <https://doi.org/10.1002/elan.1140080713>

PEREIRA, P. F.; DA SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 766, p. 87–93, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.01.034>

PETRONI, J. M.; NEVES, M. M.; DE MORAES, N. C.; BEZERRA DA SILVA, R. A.; FERREIRA, V. S.; LUCCA, B. G. Development of highly sensitive electrochemical sensor using new graphite/acrylonitrile butadiene styrene conductive composite and 3D printing-based alternative fabrication protocol. *Analytica Chimica Acta*, v. 1167, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338566>

PORTAL DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2020. PL 4541/2020 - Dispõe sobre o controle da concentração de estrogênio nos efluentes das estações de tratamento de esgoto e na água de abastecimento público. <https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=2262801>.

Acesso em: 4 jun. 2024.

PUBCHEM, 2024. Banco de dados de moléculas operado e mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 4 fev. 2024.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. <https://doi.org/10.1002/elan.200302878>

- RANGLES, J. E. B. A cathode ray polarograph. Part II. - The current-voltage curves. *Transactions of the Faraday Society*, v. 44, 1948. <https://doi.org/10.1039/TF9484400327>
- RIBEIRO, F. A. D. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v. 31, n. 1, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100029>
- RICHTER, E. M.; ROCHA, D. P.; CARDOSO, R. M.; KEEFE, E. M.; FOSTER, C. W.; MUNOZ, R. A. A.; BANKS, C. E. Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform. *Analytical Chemistry*, v. 91, n. 20, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02573>
- RICHTER, E. M.; TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; SILVA, W. P.; PÉREZ-JUNQUERA, A.; FANJUL-BOLADO, P.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; MUÑOZ, R. A. A. A Compact Batch Injection Analysis Cell for Screen Printed Electrodes: A Portable Electrochemical System for On-site Analysis. *Electroanalysis*, v. 28, n. 8, 2016. <https://doi.org/10.1002/elan.201600008>
- ROCHA, R. G.; DE FARIA, L. V.; SILVA, V. F.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Carbon Black Integrated Polylactic Acid Electrodes Obtained by Fused Deposition Modeling: A Powerful Tool for Sensing of Sulfanilamide Residues in Honey Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 71, n. 6, p. 3060–3067, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07814>
- SALC, B.; BIRYOL, I. Voltammetric investigation of β -estradiol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, n. 3–4, 2002 [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00676-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00676-8)
- ŠEVČÍK, A. Oscillographic polarography with periodical triangular voltage. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, v. 13, 1948. <https://doi.org/10.1135/cccc19480349>
- SHIN, Y.; LEE, J.; PARK, E.; LEE, J.; LEE, H. S.; KIM, J. H. A quantitative tandem mass spectrometry and scaled-down quechers approach for simultaneous analysis of pesticide multiresidues in human urine. *Molecules*, v. 24, n. 7, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24071330>
- SHUKLA, S. K.; LAVON, A.; SHMULEVICH, O.; BEN-YOAV, H. The effect of loading carbon nanotubes onto chitosan films on electrochemical dopamine sensing in the presence of biological interference. *Talanta*, v. 181, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.081>
- SILVA, A. L.; SALVADOR, G. M. da S.; CASTRO, S. V. F.; CARVALHO, N. M. F.; MUNOZ, R. A. A. A 3D Printer Guide for the Development and Application of Electrochemical Cells and Devices. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.684256>
- SILVA, V. A. O. P.; FERNANDES-JUNIOR, W. S.; ROCHA, D. P.; STEFANO, J. S.; MUNOZ, R. A. A.; BONACIN, J. A.; JANEGITZ, B. C. 3D-printed reduced graphene oxide/polylactic acid electrodes: A new prototyped platform for sensing and biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 170, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112684>
- SMAJDOR, J.; PIECH, R.; ŁAWRYWIANIEC, M.; PACZOSA-BATOR, B. Glassy carbon electrode modified with carbon black for sensitive estradiol determination by means of voltammetry and flow injection analysis with amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, v. 544, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.025>
- SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química Nova*, v. 26, n. 1, 2003. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000100015>

- SPYCHALSKA, K.; ZAJĄC, D.; WIATROWSKA, A.; CABAJ, J. Correction: Electrochemical biosensor for detection of 17 β -estradiol using semi-conducting polymer and horseradish peroxidase. *RSC Advances*, v. 10, n. 45, 2020. <https://doi.org/10.1039/d0ra90078h>
- SUPCHOCKSOONTHORN, P.; ALVIOR SINOY, M. C.; DE LUNA, M. D. G.; PAOPRASERT, P. Facile fabrication of 17 β -estradiol electrochemical sensor using polyaniline/carbon dot-coated glassy carbon electrode with synergistically enhanced electrochemical stability. *Talanta*, v. 235, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122782>
- VELOSO, W. B.; ATAIDE, V. N.; ROCHA, D. P.; NOGUEIRA, H. P.; DE SIERVO, A.; ANGNES, L.; MUÑOZ, R. A. A.; PAIXÃO, T. R. L. C. 3D-printed sensor decorated with nanomaterials by CO₂ laser ablation and electrochemical treatment for non-enzymatic tyrosine detection. *Microchimica Acta*, v. 190, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05648-8>
- WANG, J. *Analytical Electrochemistry*, Third Edition. <https://doi.org/10.1002/0471790303>
- WANG, J.; TAHA, Z. TECHNICAL NOTES Batch Injection Analysis. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- WANG, Q.; JIANG, N.; LI, N. Electrocatalytic response of dopamine at a thiolactic acid self-assembled gold electrode. *Microchemical Journal*, v. 68, n. 1, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00178-8)
- WONG, A.; SANTOS, A. M.; FAVA, E. L.; FATIBELLO-FILHO, O.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Voltammetric determination of 17 β -estradiol in different matrices using a screen-printed sensor modified with CuPc, Printex 6L carbon and Nafion film. *Microchemical Journal*, v. 147, 2019 a. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.052>
- WONG, A.; SANTOS, A. M.; FAVA, E. L.; FATIBELLO-FILHO, O.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Voltammetric determination of 17 β -estradiol in different matrices using a screen-printed sensor modified with CuPc, Printex 6L carbon and Nafion film. *Microchemical Journal*, v. 147, 2019 b. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.052>
- ZOU, Y.; LI, Y.; JIN, H.; TANG, H.; ZOU, D.; LIU, M.; YANG, Y. Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction. *Analytical Biochemistry*, v. 421, n. 2, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.007>