UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química de São Carlos

Departamento de Físico-Química

Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos

Deteção dos interferentes endócrinos estradiol e estriol em amostras ambientais e clínicas empregando eletrodos modificados com grafeno, nanopartículas metálicas e *quantum dots*

FERNANDO HENRIQUE CINCOTTO*

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Sergio A.S. Machado

*Bolsista FAPESP Proc. 2012/18339-1

São Carlos - SP

2016

Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me abençoado nesta jornada com força, coragem, persistência e equilíbrio para concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado pelas oportunidades, orientação, incentivo, amizade e confiança durante todo decorrer do trabalho, contribuindo para o meu aprendizado e crescimento profissional, além de estar sempre disponível às minhas necessidades.

Ao Prof. Dr. José Manuel Pingarrón pelo aprendizado e pela oportunidade de desenvolver uma parte do doutoramento, período de um ano, na Universidade Complutense de Madri.

Ao Prof. Dr. Reynaldo Villalonga pelo aprendizado, incentivo e confiança no decorrer do doutorado sanduiche na Universidade Complutense de Madrid, além da amizade e disponibilidade em atender minhas necessidades.

Aos professores membros da banca pela presença e correções sugeridas.

À FAPESP como órgão de financiamento: Processo no país (2012/18339-1), Processo no exterior BEPE (2014/02457-0).

À minha querida esposa Maria Gabriela José de Almeida Cincotto, pelo amor, compreensão, paciência e carinho, além do incentivo e das discussões científicas que contribuíram durante o desenvolvimento deste trabalho.

À todos que contribuíram de forma direta para a realização deste trabalho, em especial o Prof. Dr. Thiago Cruz Canevari, Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes.

Aos amigos do GMEME (Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos) do IQSC/USP.

À toda minha família, em especial à minha mãe Maria Helenice Justo Cincotto, meu pai Edson Fernando Cincotto e meu irmão Fábio Henrique Cincotto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ESQUEMAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação.....	1
1.2 Uso de grafeno em sensores eletroquímicos.....	2
1.3 Biossensores eletroquímicos.....	6
1.4 Interferentes endócrinos (EDs).....	8
1.5 β -Estradiol (E2).....	10
1.6 Estriol (E3).....	14

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2 Objetivos.....	18
------------------	----

CAPÍTULO 3 – EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções.....	20
3.2 Equipamentos.....	21
3.3 Célula eletroquímica.....	23

3.4 Eletrodos.....	23
3.4.1 Eletrodos de referência.....	23
3.4.2 Eletrodo auxiliar	23
3.4.3 Eletrodos de trabalho	23
3.4.4 Preparação dos eletrodos	24
4. Procedimentos experimentais.....	26
4.1 Síntese de óxido de grafeno (GO).....	26
4.2 Síntese de óxido de grafeno reduzido (RGO).....	26
4.3 Síntese de quantum dots de telureto de cádmio.....	26
4.4 Preparação e imobilização do material híbrido a base de óxido de grafeno e quantum dots de telureto de cádmio (GO/CdTe) sobre o eletrodo de carbono vítreo.....	27
4.5 Síntese de óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de ródio (RGO-RhNP) e preparo do eletrodo contendo enzima lacase (Lac/rGO-RhNP/GCE).....	27
4.6 Síntese de óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de antimônio (RGO-SbNP) e modificação do eletrodo de carbono vítreo.....	28
4.7 Síntese do nanomaterial híbrido baseado em GO/Sb ₂ O ₅ e preparo do biossensor enzimático Lac/GO/Sb ₂ O ₅	28

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sensor eletroquímico baseado em quantum dots suportado em óxido de grafeno para a determinação de 17 β -estradiol.....	31
--	----

5.1.1	<i>Caracterização morfológica do GO e do híbrido GO/CdTe.....</i>	35
5.1.2	<i>Estudo do comportamento eletroquímico do 17β-estradiol utilizando o eletrodo de GC/GO/CdTe.....</i>	39
5.1.3	<i>Otimizações dos parâmetros experimentais.....</i>	42
5.1.4	<i>Características analíticas.....</i>	46
5.1.5	<i>Considerações gerais.....</i>	48
5.2	<i>Biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de ródio suportadas em óxido de grafeno reduzido para a determinação de 17β-estradiol.....</i>	50
5.2.1	<i>Montagem e caracterização do eletrodo enzimático.....</i>	54
5.2.2	<i>Otimizações e aplicações do biossensor enzimático.....</i>	58
5.2.3	<i>Considerações gerais.....</i>	71
5.3	<i>Combinação sinérgica de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de antimônio para a determinação do hormônio estriol.....</i>	72
5.3.1	<i>Comportamento eletroquímico do eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs em relação ao processo de oxidação de estriol.....</i>	75
5.3.2	<i>Parâmetros para a otimização da resposta voltamétrica de estriol no eletrodo compósito GG/rGO-SbNPs.....</i>	77
5.3.3	<i>Comparação do comportamento voltamétrico de estriol nos eletrodos modificados.....</i>	79
5.3.4	<i>Determinação de estriol na presença de possíveis interferentes.....</i>	81
5.3.5	<i>Características analíticas.....</i>	81
5.3.6	<i>Análise do hormônio estriol em águas naturais.....</i>	83
5.3.7	<i>Considerações gerais.....</i>	85

5.4	Nanomaterial híbrido baseado em Grafeno/Sb ₂ O ₅ /lacase para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico na determinação de estriol.....	86
5.4.1	<i>Resposta do biossensor eletroquímico enzimático na determinação de estriol.....</i>	90
5.4.2	<i>Otimizações dos parâmetros experimentais.....</i>	93
5.4.3	<i>Características analíticas.....</i>	95
5.4.4	<i>Considerações gerais.....</i>	100

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

6	Conclusões.....	103
---	-----------------	-----

PERSPECTIVAS FUTURAS

	Metodologias e Perspectivas Futuras.....	106
--	--	-----

	PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO.....	108
--	---	-----

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7	Referências bibliográficas.....	112
---	---------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM – Microscopia de força atômica

Ag/AgCl – Eletrodo de prata/cloreto de prata

CH₃COONa – Acetato de sódio

DLS – Dispersão de luz dinâmica (*dynamic light scattering*)

DMF – Dimetilformamida

DPV - Voltametria de pulso diferencial

E1 – Estrona

E2 – 17β-estradiol

E3 – Estriol

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva de raios X

EDs – Interferentes endócrinos

EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{pc} – Potencial de pico catódico

$E_{pré-tratamento}$ – Potencial de pré-tratamento

FEG-SEM – Microscopia eletrônica de varredura acoplada a um canhão de elétrons

FT-IR – Infravermelho com transformada de Fourier

GC – Carbono vítreo (do inglês, *glassy carbon*)

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, *glassy carbon electrode*)

GO – Óxido de grafeno (do inglês, *graphene oxide*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HRTEM – Microscopia de transmissão eletrônica de alta resolução

I_{pa} – Corrente de pico anódica

I_{pc} – Corrente de pico catódica

K₃[Fe(CN)₆] – Hexacianoferrato de potássio

Lac – Lacase

LOD – Limite de detecção

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Ox – Oxidado

PBS – Solução tampão fosfato (do inglês, *phosphate-buffered solution*)

QDs – *Quantum dots*

Red – Reduzido

R_{et} – Resistência de transferência de elétrons

RGO e rGO – Óxido de grafeno reduzido (do inglês, *reduced graphene oxide*)

RhNPs e RhNP – Nanopartículas de ródio

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation*)

SAED – Área selecionada de difração de elétrons

SbNPs e SbNP – Nanopartículas de antimônio

TEM – Microscopia de transmissão eletrônica

TMP – Trimethoprim

VC e CV – Voltametria cíclica (do inglês, *cyclic voltammetry*)

XPS – Espectros de raios-X de fotoelétron

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho.....	20
Tabela 2. Valores das energias de ligação XPS (eV) obtidos para o GO.....	38
Tabela 3. Comparação do desempenho analítico de biossensores eletroquímicos relevantes para 17 β -estradiol.	67
Tabela 4. Resultados na determinação de estriol em amostras naturais de água (enriquecida com estriol) pelo método eletroquímico (DPV) e utilizando HPLC.	84
Tabela 5. Resumo dos valores de energia de ligação em elétron-volts (eV) para Sb3d3/2, Sb3d5/2 O1s, Sb4d e C1s componentes do material GO/Sb ₂ O ₅	87
Tabela 6. Comparação do biossensor GCE/GO/Sb ₂ O ₅ /laccase frente a literatura.	97
Tabela 7. Relação dos resultados obtidos da análise em amostras reais de urina e água.	99

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Preparação do nanocompósito RGO-RhNP e do biossensor Lac/RGO-RhNP.	50
Esquema 2. Visualização esquemática da reação envolvida na imobilização de lacase na superfície do eletrodo por meio de ligação cruzada do grupo amino primário da enzima e dos grupos hidroxilos do nanocompósito RGO-RhNP com glutaraldeído.	55
Esquema 3. Visualização esquemática do mecanismo eletrocatalítico proposto para o biossensor enzimático.	63
Esquema 4. Exibição esquemática das etapas envolvidas na preparação do nanohíbrido GO/Sb ₂ O ₅ e o eletrodo enzimático Lac/GO/Sb ₂ O ₅ /GCE.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Base de todas as formas de grafite.	3
Figura 2. Breve mecanismo de oxidação do 17 β -estradiol.	12
Figura 3. Estrutura química do hormônio estriol.	14
Figura 4. Medidas de DLS da distribuição dos tamanhos de partícula, utilizando luz monocromática em um comprimento de onda 250 nm.	32
Figura 5. Frasco contendo <i>quantum dots</i> de CdTe na ausência (imagem à esquerda) e na presença da irradiação de luz ultravioleta (imagem à direita).	33
Figura 6. Espectros de absorção no UV-Vis (—) e fotoluminescência (o) da suspensão dos <i>quantum dots</i> de CdTe, com comprimento de onda de excitação em 400 nm.	34
Figura 7. Imagem de TEM para as nanofolhas de grafeno oxidado. Detalhe: Espectro de Raman para as nanofolhas de grafeno oxidado.	36
Figura 8. Espectro de absorção na região do infravermelho para uma amostra de grafeno oxidado.	37
Figura 9. Imagem de TEM para o sistema GO/CdTe. Detalhe: Histograma da distribuição do tamanho de partículas dos QDs.	39
Figura 10. Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de GC/GO/CdTe na presença de 17 β -estradiol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ curva (a) e ausência de 17 β -estradiol curva (b), com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Meio eletrolítico de PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0). Detalhe: Mecanismo proposto para a oxidação eletroquímica do 17 β -estradiol.	40
Figura 11. Voltamogramas de DPV para o eletrodo de GC/GO/CdTe na presença de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 17 β -estradiol em duas condições: (curva a) escuro e (curva b) presença de luz incidente. Detalhe: Resposta da fotocorrente do eletrodo de GC/GO/CdTe em um três ciclos liga/desliga para a luz incidente.	41
Figura 12. Célua fotoeletroquímica utilizada mostrando a lâmpada de Hg acoplada diretamente no fundo da célula.	42
Figura 13. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos de GC/GO/CdTe em diferentes eletrólitos contendo 17 β -estradiol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	43
Figura 14. Voltamogramas de DPV em meio de solução 0,1 mol L^{-1} de CH_3COONa e 0,1 mol L^{-1} de PBS, cada um contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 17 β -estradiol.	44
Figura 15. Efeito do potencial de pré-tratamento no pico de corrente do processo de oxidação do hormônio em PBS 0,1 mol L^{-1} contendo 17 β -estradiol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	45
Figura 16. Efeito do tempo de pré-tratamento, utilizando as mesmas condições, com $E_{\text{pré-tratamento}} = -0,9$ V. Tempos estudados: 30, 40, 50, 60 120, 150, 180 e 360 s.	45
Figura 17. Dependência linear do pico de corrente de DPV e a concentração de 17 β -estradiol para o eletrodo de GC/GO/CdTe: no escuro (●) e na presença de luz (□). As concentrações de 17 β -estradiol em $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram: 0,20; 0,50; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00; 5,00; 10,00; 12,50; 15,00; 17,50 e 20,00.	47
Figura 18. Imagens das análises de microscopias TEM (A, B) e HRTEM (C) do nanocompósito RGO-RhNP. Análise EDS do nanomaterial (D).	52
Figura 19. Espectroscopias de FT-IR (A), e Raman (B), análise de GO (a) e RGO-RhNP (b). Análise de AFM (C) e perfil topográfico de AFM do nanocompósito RGO-RhNP.	53
Figura 20. Imagens MEV de GO (A), RGO-RhNP (B) e Lac/RGO-RhNP/GCE (C).	54
Figura 21. Resposta voltamétrica para os eletrodos de Lac/RGO-RhNP/GCE, preparado usando 3 μmol de glutaraldeído (a) ou poli (etilenoglicol) éter diglicidílico (b), como agentes de reticulação, em	

tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo 1 mM de tionina antes (0) e após (1) adição de 17 β -estradiol a 50 nmol L ⁻¹ de concentração final. Velocidade de varredura: 25 mVs ⁻¹	55
Figura 22. Voltamogramas cíclicos em resposta ao eletrodo modificado com Lac/RGO- RhNP/GCE (A) em tampão de fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0 contendo 1 mM de tionina, e Lac/OsP/RGO- RhNP/GCE (B) em tampão de fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0, na ausência (a) e na presença (b) de 0,5 μ M de 17 β -estradiol. Velocidade de varredura: 50 mVs ⁻¹	57
Figura 23. A) Voltametria cíclica de GO/GCE (a) e RGO-RhNP/GCE (b) em HCl 0,5 M, v = 25 mVs ⁻¹ . B) Espectros de impedância eletroquímica referentes a resposta do GCE antes (a) e após o revestimento com o filme de RGO-RhNP (b) e Lac/RGO-RhNP em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo 5 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (1: 1).	58
Figura 24. Influência da quantidade de RGO-RhNP (A) lacase (B) e glutaraldeído (C) em relação ao sinal de DPV para o eletrodo enzimático em determinação de 0,5 μ mol L ⁻¹ de 17 β -estradiol em tampão de fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0 contendo 1 mmol L ⁻¹ de tionina. Amplitude de pulso = 75 mV, passo de potencial = 1 mV.	59
Figura 25. Voltamogramas cíclicos (A) e pulso diferencial (B), em resposta ao eletrodo GCE (a), GO/GCE (b), Lac/GO/GCE (c), RGO-RhNP/GCE (d) e Lac/RGO-RhNP/GCE (e) na determinação de 0,5 μ mol L ⁻¹ de 17 β -estradiol em condições otimizadas.	61
Figura 26. Resposta de DPV em relação ao eletrodo enzimático na determinação de 0,5 μ mol L ⁻¹ de 17 β -estradiol em condições otimizadas, na ausência (a) e na presença (b) de 1 mmol L ⁻¹ de tionina.	61
Figura 27. Voltamogramas cíclicos em relação ao eletrodo Lac/RGO-RhNP/GCE em condições otimizadas, com velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ (A) e 25 mV s ⁻¹ (B) na ausência (a) e na presença de 5 nM (b), 10 nM (c), 15 nM (d), 20 nM (e), 30 nM (f), 40 nM (g) e 50 nM (h) de 17 β -estradiol.	62
Figura 28. Influência do pH (A), concentração de tionina (B), amplitude de pulso (C) e o passo de potencial (D) sobre o sinal analítico de DPV para o eletrodo enzimático na determinação de 0,5 μ mol L ⁻¹ de 17 β -estradiol em tampão de fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0.	64
Figura 29. Análises de DPV em relação ao eletrodo rGO-RhNP/GCE na determinação de 2,5 2,5 μ mol L ⁻¹ de 17 β -estradiol em tampão de fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,0 (a), pH 6,0 (b) e pH 7,0 (c) na presença de 70 μ g de enzima lacase livre.	65
Figura 30. A) DP voltamogramas registrados no eletrodo enzimático nanoestruturado para 0 (a), 0,9 pM (b), 1,8 pM (c), 2,7 pM (d), 3,6 pM (e), 5,4 pM (f), 7,2 pM (g), 8,9 pM (h) e 11,0 pM (i) de 17 β -estradiol. B) Curva analítica construída para 17 β -estradiol realizada no biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE.	66
Figura 31. Curva de calibração construídas para 17 β -estradiol utilizando biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE (A) e sinais analíticos obtidos para 3,6 μ M de 17 β -estradiol em análises de injeção de fluxo (B).	68
Figura 32. Efeito do tempo de armazenamento a 4°C na inclinação da curva de calibração do biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE.	69
Figura 33. Curva analítica construída a partir da análise de 17 β -estradiol utilizando o biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE para urina sintética fortificada (A) e amostra real de urina (B).	70
Figura 34. Micrografias FEG-SEM para os composto (A) GO, (B) rGO e (C) rGO-SbNPs. Destaque (A) e (B) apresentam espectros Raman para as folhas de GO e rGO, respectivamente.	73
Figura 35. Voltametria cíclica em 0,5 mol L ⁻¹ de HCl, com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ para os eletrodos: (a) GC/GO, (b) GC/rGO e (c) GC/rGO-SbNPs.	74
Figura 36. Voltametria cíclica em resposta ao eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs em 0,1 mol L ⁻¹ PBS pH 7,0, na ausência (linha pontilhada) e na presença (linha cheia) de 50,0 μ mol L ⁻¹ de estríol com uma	

velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . Detalhe: mecanismo eletroquímico proposto para a oxidação de estriol.....	76
Figura 37. Efeito do pH sobre o potencial de pico (■) e de corrente de pico (●) para a oxidação de estriol em resposta ao eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs em PBS 0,1 mol L ⁻¹ contendo estriol 50,0 μmol L ⁻¹	77
Figura 38. Otimização dos parâmetros utilizados na determinação de estriol (50,0 μmol L ⁻¹ de concentração) utilizando DPV em 0,1 mol L ⁻¹ de PBS, pH 9,0: (A) Efeito do potencial de pré-tratamento sobre a corrente de pico de oxidação de estriol e (B) A dependência da corrente de pico de oxidação de estriol e porcentagem de SbCl ₃ na composição do eletrodo compósito.....	78
Figura 39. Voltamogramas de DPV obtidos sob os parâmetros otimizados em 0,1 mol L ⁻¹ de PBS, pH 9,0, contendo 50,0 μmol L ⁻¹ de estriol para os seguintes eletrodos: (a) GC, (b) GC/GO, (c) GC/rGO e, (d) GC/rGO-SbNPs.	80
Figura 40. Voltamogramas de DPV em relação ao eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs, obtidos com os parâmetros otimizados. As concentrações de estriol em μmol L ⁻¹ foram: (a) 0,20, (b) 0,40, (c) 0,60, (d), 0,80, (e) 1,0, (f) de 1,2, e (g) 1,4. Destaque: dependência linear das correntes de picos com as concentrações de estriol.	82
Figura 41. (A) DPV obtidos utilizando o eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs na determinação de estriol em água natural: (S) amostra; (a) amostra enriquecida com 0,70 μmol L ⁻¹ de estriol; (b) amostra enriquecida com 0,80 μmol L ⁻¹ de estriol; (c) amostra enriquecida com 0,90 μmol L ⁻¹ de estriol. Destaque: dependência linear dos picos de corrente com concentrações de estriol. (B) Cromatogramas para a amostra de água natural antes (curva B) e após (curva S) enriquecida com 0,5 μmol L ⁻¹ de estriol.....	84
Figura 42. Espectros XPS obtidos do material híbrido GO/Sb ₂ O ₅	87
Figura 43. Imagem TEM de GO (A) e GO/Sb ₂ O ₅ (B). Imagem HRTEM de GO/Sb ₂ O ₅ (C). Análise elementar (D) e área selecionada padrão de difração de elétrons (no detalhe) de GO/Sb ₂ O ₅	88
Figura 44. Imagens de FEG-SEM de (A) GO/Sb ₂ O ₅ e (B) Lac/GO/Sb ₂ O ₅	89
Figura 45. Imagem obtida com o AFM e análise da secção indicada como uma linha preta para GO/Sb ₂ O ₅	89
Figura 46. Efeito da concentração de lacase sobre a resposta do biossensor amperométrico mantendo-se constante a concentração de estriol em 10 μmol L ⁻¹ de PBS (pH 7) 0,1 mol L ⁻¹ . Potencial de trabalho: -0,3V vs. Ag/AgCl.	90
Figura 47. Efeito da concentração de glutaraldeído na resposta amperométrica de estriol na concentração de 10 μmol L ⁻¹ em 0,1 mol L ⁻¹ de PBS (pH 7). Potencial de trabalho: -0,3V vs. Ag/AgCl.	91
Figura 48. Os espectros de impedância eletroquímica obtidos em um eletrodo de carbono vítreo, antes (a) e após a modificação com GO/Sb ₂ O ₅ (b), e ainda a imobilização de lacase (c), em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo 5 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1).	92
Figura 49. Voltamogramas cíclicos obtidos para CGE (a), Lac/GCE (b), GO/Sb ₂ O ₅ /GCE (c) e Lac/GO/Sb ₂ O ₅ /GCE (d) em 2,0 μmol L ⁻¹ de estriol em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0, na presença de 1 mmol L ⁻¹ de tionina, a velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	93
Figura 50. Efeito da concentração de tionina na resposta amperométrica de 10 μmol L ⁻¹ de estriol em 0,1 mol L ⁻¹ de PBS (pH 7,0). Potencial de trabalho: -0,3V vs. Ag/AgCl.....	94
Figura 51. Corrente (<i>i</i>) versus o intervalo de pH mantendo a concentração de estriol fixada em 10 μmol L ⁻¹ na presença de tionina (1,0 mmol L ⁻¹). Condições experimentais: potencial aplicado -0,3 V, 0,1 mol L ⁻¹ de solução tampão fosfato, pH 7.	94

Figura 52. Efeito do potencial de trabalho aplicado na resposta do biossensor amperométrico, em presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH 7,0) e tionina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$).	95
Figura 53. Típica curva de resposta corrente-tempo em sucessivas adições de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tionina em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 7). A faixa de concentração de estriol foi de $0,025 - 1,025 \mu\text{mol L}^{-1}$	96
Figura 54. Curva de calibração do biossensor GCE/GO/Sb ₂ O ₅ /lacase para o estriol.	97
Figura 55. Corrente (<i>i</i>) em função do tempo em adições de dopamina, catecol, hidroquinona, ácido ascórbico e o estriol na célula electroquímica nos tempos de 500, 590, 660 e 720 s. Concentrações (em mol L^{-1}) dos analitos na célula eletroquímica: A [dopamina] = 10×10^{-5} , B [catecol] = 10×10^{-5} ; C [hidroquinona] = 10×10^{-5} , D [ácido ascórbico] = 10×10^{-5} , E [estriol] = 10×10^{-6} , A' [dopamina] = 20×10^{-5} , B' [catecol] = 20×10^{-5} ; C' [hidroquinona] = 20×10^{-5} , D' [ácido ascórbico] = 20×10^{-5} , F [estriol] = $20 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Condições experimentais: potencial aplicado -0,3 V, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução de PBS a pH 7, em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ tionina.....	98
Figura 56. Percentagem obtida na determinação do estriol pelo decréscimo da resposta de corrente do biossensor para 0, 1, 2, 7, 15, 20 e 30 dias.	100

RESUMO

Deteção dos interferentes endócrinos estradiol e estriol em amostras ambientais e clínicas empregando eletrodos modificados com grafeno, nanopartículas metálicas e *quantum dots*

Para o desenvolvimento dos sensores aqui descritos foram utilizados materiais inovadores considerando relatos atuais da literatura, materiais estes: óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido, nanocompósitos de grafeno e nanopartículas (ródio, antimônio e sílica mesoporosa desordenada), materiais híbridos a base de grafeno e *quantum dots* de CdTe, além de biossensores incorporando a enzima lacase. Estes materiais foram sintetizados utilizando metodologias específicas e caracterizados por diversas técnicas analíticas como microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, microscopia de força atômica, espectroscopia Raman, difração de raios-X, espectroscopias de UV-Vis e fotoluminescência, e técnicas eletroquímicas. Posteriormente, os materiais foram utilizados para modificação em eletrodos de carbono vítreo e utilizados na determinação de interferentes endócrinos (os hormônios estriol e 17β -estradiol) como sensores eletroquímicos em amostras ambientais e clínicas. Foi desenvolvido um sensor eletroquímico baseado em *quantum dots* suportado em óxido de grafeno para a determinação de 17β -estradiol, obtendo-se um limite de detecção de $2,8 \text{ nmol L}^{-1}$. Foi desenvolvido um biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de rádio suportadas em óxido de grafeno reduzido para a determinação de 17β -estradiol, obtendo-se um limite de detecção de $0,54 \text{ pmol L}^{-1}$. Um sensor eletroquímico foi desenvolvido com base em óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de antimônio para a determinação do hormônio estriol, onde o limite de detecção obtido foi de $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$. Foi desenvolvido um nanomaterial híbrido baseado em grafeno, Sb_2O_5 e lacase para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico na determinação de estriol, onde o limite de detecção obtido foi de 11 nmol L^{-1} . Em essência, os eletrodos desenvolvidos apresentaram importantes vantagens, tais como alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e procedimentos analíticos rápidos, apresentando baixos limites de detecção, na ordem de picomolar e nanomolar, com baixa interferência de outras espécies na mesma matriz da amostra. Concluindo assim que as técnicas eletroquímicas podem ser facilmente aplicadas na determinação de interferentes endócrinos em amostras reais.

ABSTRACT

Detection of endocrine disruptors estradiol and estriol in environmental and clinical samples using modified electrodes with graphene, metal nanoparticles and quantum dots

The development of the sensors described in the present study employed several reports from distinctive journals, using state of the art materials, such as: Graphene oxide, reduced graphene oxide, graphene nanocomposites in association with nanoparticles e.g., rhodium and antimony, hybrid materials composed by graphene and CdTe quantum dots, and biosensors in which the laccase enzyme was incorporated.

Specific synthesis methodologies were applied for each used material, and several characterization techniques e.g., transmission electron microscopy, high resolution transmission electron microscopy, atomic force microscopy, Raman spectroscopy, X-ray diffraction, UV-Vis and photoluminescence spectroscopy and electrochemical techniques were employed as well. Subsequently, glassy carbon electrodes were modified with the synthesized materials to permit the determination of endocrine disruptors (estriol and 17β -estradiol hormone), working as electrochemical sensors for environmental and clinical samples. For the determination of 17β -estradiol, an electrochemical sensor based on quantum dots supported in graphene oxide and an electrochemical biosensor based on rhodium nanoparticles supported in reduced graphene oxide were developed, in which a limit of detection of 2.8 nmol L^{-1} and 0.54 pmol L^{-1} were obtained respectively. For the determination of the estriol hormone, an electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and antimony nanoparticles, and an amperometric biosensor, composed by a hybrid nanomaterial based on graphene, Sb_2O_5 and laccase were developed, in which a limit of detection of 0.5 nmol L^{-1} and 11 nmol L^{-1} were obtained respectively. Essentially, the developed electrodes have shown important advantages, such as high sensitivity, good reproducibility and quick analytical procedures, obtaining low detection limits in picomolar and nanomolar range and low interference rate from other species in the sample's matrix. This concludes that electrochemical techniques can be easily applied in the determination of endocrine disruptors in real samples.

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Apresentação

Os métodos de análise consistem na utilização de técnicas analíticas com a finalidade de separar, identificar e/ou quantificar substâncias de interesse. As substâncias referentes à área medicinal, ambiental ou que possuam grande impacto econômico devem sempre exigir um complicado protocolo de análise. Esses métodos padrões de análise, bem como os níveis mínimos e máximos estabelecidos para essas substâncias em amostras distintas são determinados por legislações específicas de um país, conglomerados de países ou por agências mundialmente reconhecidas como a Farmacopeia Europeia e Americana, OMS (Organização Mundial de Saúde), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), USEPA (United States Environmental Protection Agency), EEA (European Environmental Agency). No Brasil, os principais órgãos de legislação consistem na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e no CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente).

Os métodos oficiais de análise das substâncias estudadas neste trabalho, como os interferentes endócrinos (17β -estradiol, estriol) empregam, quase que exclusivamente, métodos cromatográficos. As técnicas cromatográficas possuem alta sensibilidade e seletividade na determinação das substâncias mencionadas anteriormente, conferindo ao protocolo de análise a confiabilidade exigida. Contudo, elas também apresentam algumas limitações, como a necessidade de várias etapas de pré-tratamento (preparação de amostra, extração, *clean up*, derivatizações da amostra em meio ácido ou alcalino). Essas etapas têm como objetivo obter um extrato final totalmente compatível com a técnica. Na cromatografia líquida, normalmente, durante o procedimento analítico, são geradas altas quantidades de resíduos contendo solventes orgânicos que, além de serem tóxicos, tornam o procedimento mais complicado e caro. Outro ponto a salientar é que a cromatografia não permite a análise em campo, direta, em tempo real e *in situ*. Nesse contexto, o uso das técnicas eletroanalíticas aparece como uma alternativa aos métodos oficiais de análise.

Métodos eletroquímicos têm como vantagem baixo custo, alta sensibilidade, facilidade de operação, potencialidade de miniaturização e automação. Permitem a construção de dispositivos simples, portáteis e possibilitam o monitoramento rápido de substâncias diretamente no campo e em tempo real (*in situ / in loco*).

Entretanto, alguns pontos têm de ser levados em consideração no desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica de monitoramento. A construção do sensor deve ser feita de

modo que esse possua maior sensibilidade, seletividade, robustez, etc. Para isso, nas etapas de construção, a escolha do transdutor é de suma importância, pois esse deve possuir, principalmente, atividade eletrocatalítica adequada para o analito alvo e servir de suporte para possíveis agentes modificadores fixados à superfície pela imobilização de diferentes substâncias.

Dentre os transdutores mais utilizados podem ser destacados os eletrodos metálicos como ouro ^{1; 2} e platina ^{3; 4} e os eletrodos à base de carbono como o diamante dopado com boro (BDD) ^{5; 6}, carbono pirolítico altamente ordenado (HOPG) ⁷, carbono vítreo (GC) ^{8; 9} e os compósitos à base de carbono, como a pasta de carbono ^{10; 11}, o grafite epóxi ¹², nanotubos de carbono de parede simples ^{13; 14} e parede múltiplas ^{15; 16}, dentre outros.

Outro item relevante na área de desenvolvimento e construção de sensores eletroquímicos é a utilização de modificadores, cuja principal finalidade é propiciar um aumento na sensibilidade e na seletividade do sensor. A busca de novos materiais para modificação de sensores é alvo de diversos grupos de pesquisa em todo mundo. Dentre os materiais mais estudados e utilizados, atualmente, encontram-se os filmes e compósitos à base de grafeno. As propriedades e diversas aplicações de grafeno serão discutidas a seguir, bem como a utilização de modificadores, como as nanopartículas metálicas no desenvolvimento de sistemas sinérgicos, onde a principal finalidade é aumentar a sensibilidade dos sensores.

1.2 Uso de grafeno em sensores eletroquímicos

Até os anos 1980, os alótropos de carbono conhecidos se limitavam aos conhecidos materiais de grafite, diamante, carbono vítreo e carbono pirolítico. Isto mudou totalmente com a descoberta dos fulerenos, nanotubos de carbono e, recentemente, 2-D grafeno ^{17; 18; 19}. Recentemente, o grafeno tem atraído enorme interesse de pesquisa devido às suas características estruturais únicas e excelente desempenho, que decorrem do fato de ser formado por uma única camada de carbono em sua rede bidimensional ²⁰, ao qual contrasta com a estrutura tridimensional lamelar de grafite (**Figura 1**). No entanto, existe a forte tendência das plaquetas individuais de grafeno se aglomerarem devido às fortes interações π - π e interações de van der Waals ²¹, podendo ter um efeito prejudicial significativo sobre as propriedades do material final. Logo, inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas para controlar a dispersão de grafeno, limitar sua re-aglomeração e melhorar sua sensibilidade. As metodologias existentes envolvem tanto processos químicos quanto físicos para separar as

folhas de grafeno, seguido por modificações da superfície para perturbar a reformação das interações π - π e interações de van der Waals.

Figura 1. Base de todas as formas de grafite.

Fonte: Geim, A. K. *et al.*, 2007 ²².

Uma variação interessante de grafeno é a utilização de sua forma oxidada (óxido de grafeno ou grafeno oxidado - GO), a qual tem sido preparada pelo método modificado de Hummers ^{17; 23} e extensamente aplicada por oferecer várias vantagens devido à sua superfície química oxidada, além de ser facilmente convertida de volta a grafeno. Os principais grupos químicos presentes no GO são hidroxila, carboxila, cetona, diol e epóxi ^{24; 25; 26}, que permitem sua dispersão em água e solventes polares ^{27; 28} e, com o auxílio de surfactantes, em solventes orgânicos ²⁹. A funcionalização da superfície do GO está associada com a mudança na hibridização de um ou mais átomos de carbono sp^2 da rede de carbono para a hibridização sp^3 , acompanhada pela perda simultânea da conjugação de elétrons ³⁰.

Outra variação interessante de grafeno é sua forma reduzida (óxido de grafeno reduzido – rGO ou RGO). O rGO possui as características semelhantes das nanofolhas grafeno, a estrutura bidimensional singular formada por algumas camadas de átomos de carbono sp^2 , num sistema π conjugado promovendo alta mobilidade dos elétrons e, assim, rápida transferência de elétrons, permitindo o aparecimento de um efeito eletrocatalítico.

Uma abordagem interessante para aplicação de grafeno que vem ganhando espaço no meio científico consiste em sua modificação com nanopartículas metálicas, a qual tem demonstrado excelentes resultados em seu uso como sensores eletroquímicos. Como exemplo, Liu *et al.*³¹ funcionalizaram as folhas de GO com nanopartículas de platina e glicose oxidase para avaliar a sua aplicação como biossensor na determinação de glicose alcançando um limite de detecção de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$. Neste caso a Pt atuou como um espaçador mecânico entre as folhas de grafeno, o que acarretou em sua separação e aumentou a área superficial, ao mesmo tempo em que mantinha a atividade biocatalítica da enzima devido às nanopartículas metálicas serem bastante biocompatíveis.

Cincotto *et al.*³² desenvolveram um material nanoestruturado com base em nanopartículas de paládio (PdNPs) suportados em óxido de grafeno reduzido, caracterizados e aplicados na análise de antidepressivos em amostras reais de urina. Este material nanoestruturado produziu excelente sensibilidade na determinação de desipramina, bem como uma alta atividade eletrocatalítica e um baixo limite de detecção. O eletrodo de carbono vítreo modificado com o material de rGO/PdNPs mostrou-se promissor no desenvolvimento de um método rápido, simples e sensível para controlar os níveis de antidepressivo na urina.

Cincotto *et al.*³³ descreveram a síntese, caracterização e aplicação de um novo material híbrido para a determinação simultânea de epinefrina e dopamina por redução eletroquímica, utilizando um material híbrido de sílica mesoporosa (SiO_2) e óxido de grafeno decorados com nanopartículas de prata. Este material híbrido, SiO_2/GO , foi decorado com nanopartículas de prata (AgNPs) com um tamanho inferior a 20 nanômetros, preparado diretamente sobre a superfície do material. O eletrodo de carbono vítreo modificado com AgNPs/ SiO_2/GO foi usado na determinação simultânea de epinefrina e dopamina utilizando a redução eletrocatalítica pela técnica de voltametria de onda quadrada. Um aspecto muito inovador neste trabalho foi a determinação por eletro-redução, muito mais rara, e que não sofre competição com outras moléculas orgânicas ou íons metálicos oxidáveis. O sensor desenvolvido foi sensível para a determinação simultânea de dopamina e epinefrina, com os limites de detecção sendo $0,26$ e $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Eletrodo modificado com o nanomaterial apresentou-se altamente seletivo e pode ser utilizado para determinar a dopamina e a epinefrina em amostras clínicas.

Vários artigos publicados têm demonstrado que o grafeno, nas suas duas formas (oxidada e reduzida) promovem reações de transferência eletrônica em baixos

sobrepotenciais. Essa vantagem tem inspirado uma crescente quantidade de pesquisa que acoplam os sensores baseados em grafeno com enzimas.

Rabti *et al.*³⁴ desenvolveram um sensor eletroquímico utilizando óxido de grafeno reduzido funcionalizado com ferroceno como plataforma de imobilização da enzima glicose oxidase. Os autores obtiveram resultados satisfatórios para a preparação de sensores de baixo custo, sendo eficazes e descartáveis, podendo ser aplicados na detecção de H_2O_2 livre de enzima e de detecção enzimática da glicose como analitos modelos. Ainda, foi relatado um baixo limite de detecção de $0,44 \mu\text{mol L}^{-1}$ na determinação de glicose. Este trabalho apresenta resultados que podem ter grande interesse, uma vez que foi demonstrado usar uma metodologia relativamente simples na funcionalização de grafeno na confecção de um biossensor para glicose.

Gu Zhiguo *et al.*³⁵, desenvolveram um biossensor utilizando GO, *quantum dots* de CdTe-CdS, nanopartículas de ouro e glicose oxidase para determinar glicose, reportando uma faixa linear de resposta de $1,0 \times 10^{-11}$ a $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$. O sensor mostrou-se extremamente sensível e estável mantendo uma resposta de até 95% do valor original para uma concentração de $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ por um período de 26 semanas. Os autores ainda demonstraram que a inserção dos *quantum dots* na arquitetura superficial do sensor aumentou drasticamente o seu desempenho na determinação do analito.

O uso de *quantum dots* (QDs, ponto quântico) como novos materiais para sensores torna-se extremamente promissor e inicia um campo de pesquisa ainda pouco explorado. QDs são nanocristais semicondutores que geralmente apresentam dimensões na faixa de 2-6 nm³⁶ e que apresentam propriedades óptico-eletrônicas intermediárias entre moléculas e semicondutores. Estas propriedades resultam da combinação entre a natureza química do material e sua dimensão, o que pode acarretar no surgimento de um “confinamento quântico”, ou seja, limitações quânticas para a promoção de elétrons entre os níveis de Fermi do material³⁷. Dependendo da forma e dimensões de um nanocristal ele pode apresentar um determinado *band gap* sobre a superfície de outro material de *gap* maior depositado sobre si. Dessa forma, o elétron fica confinado nas três direções causando o confinamento quântico e resultando em uma forte quantização dos níveis de energia. Essa quantização da energia no ponto de confinamento faz com que o material absorva energia com comprimento de onda específico e energia equivalente à dos elétrons confinados³⁸. No entanto, a separação eficiente de carga (elétrons e buracos, ou vacâncias) em QDs se coloca como o principal desafio para sua síntese

Nesse sentido, um dos melhores métodos para a separação de carga é a síntese de semicondutores nanoestruturados do tipo *core-shell* (“núcleo-casca”), que podem ser sintetizados pela combinação de dois ou mais semicondutores com uma adequada incompatibilidade de rede entre eles⁴⁰. Um progresso considerável foi alcançado na síntese de QDs do tipo II (QDs *core-shell* que apresentam os elétrons e buracos fotoexcitados separados espacialmente, enquanto um encontra-se no core o outro encontra-se no *shell*). Estes elétrons e buracos altamente excitados são chamados de elétrons quentes e buracos quentes (ou carregadores de carga quentes). Estes QDs *core-shell* são constituídos por dois materiais semicondutores com um alinhamento espacial de condução e as bordas da banda de valência na interface, o qual cria um potencial radial que favorece a localização de um dos portadores no núcleo (core) do QD e o outro em sua parte “externa” (*shell*)^{41; 42}.

1.3 Biossensores eletroquímicos

O princípio de funcionamento de um biossensor é a integração de um elemento de reconhecimento biológico e um transdutor. A especificidade do primeiro e a sensibilidade do segundo conferem as propriedades analíticas únicas destes dispositivos. Além disto, ainda se pode apontar outros aspectos vantajosos, tais como a velocidade de resposta, a capacidade de miniaturização, a facilidade de utilização e, acima de tudo, a possibilidade das análises serem diretas e em tempo real em amostras complexas. A reação de reconhecimento molecular que ocorre na primeira parte do biossensor é reconhecida na segunda parte como um sinal elétrico ou óptico, tipicamente, sendo diretamente relacionada com a concentração da substância a ser determinada. Os dois componentes formam uma unidade funcional, cuja seletividade é dada pela interação do analito com o elemento biológico, e em que a sensibilidade é alcançada por um mecanismo de transdução adequado.

Idealmente, o biossensor deve responder contínua e reversivelmente somente às espécies de interesse, sem alterar a amostra, eliminando assim a necessidade de pré-tratamento. Os biossensores proporcionam, por um lado, uma integração temporária, que permite realizar um processo de medida química direta e obter um sinal contínuo e reversível, e por outro lado, uma integração espacial, que favorece a miniaturização.

A técnica instrumental em que o transdutor se baseia é utilizada como um critério de classificação de biossensores. Entre eles, estão os eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, condutimétricos ou impedimétricos) e ópticos (espectrofotométricos,

fluorimétricos ou com base na medição de ressonância de plasma de superfície, SPR), são os mais comuns.

Nos últimos anos, as aplicações de biossensores têm-se multiplicado em todas as áreas de interesse analítico, com destaque para as relacionadas com alimentos, meio ambiente e saúde. Centrando-se nesta última, o uso de biossensores atinge atualmente todos os tipos de determinações que se realizam nas áreas farmacêuticas e médicas, tanto no controle de produção quanto para o diagnóstico e monitoramento de rotina de doenças. Desde o desenvolvimento, nos anos sessenta, do primeiro biossensor de glicose a partir de um eletrodo de Clark^{43; 44}, que marcou o início da demonstração da enorme utilidade tecnológica desta ferramenta analítica, a pesquisa nesta área tem crescido a um ritmo vertiginoso. Hoje em dia, as características de biossensores tornaram-se indispensáveis em outras aplicações clínicas, em que cada vez mais são necessárias para monitorar compostos específicos, quase sempre presentes em baixas concentrações. Alguns exemplos incluem neurotransmissores, fármacos ou mesmo o colesterol, para os quais muitas configurações têm sido descritas e, mais recentemente, os biomarcadores tumorais e de doenças cardiovasculares, de transtornos renais, hepáticos e de outros órgãos. Um biomarcador é uma substância bioquímica característica, que pode ser medido objetivamente e que se utiliza, fundamentalmente, para detectar uma doença (marcador de diagnóstico), acompanhar sua evolução (marcador de prognóstico) ou escolher um tratamento (marcador preditivo) e monitorá-lo. Com isso, os hormônios, participantes em muitos processos fisiológicos importantes, são algumas das espécies que são monitorados nesta área específica, além de ser objetivo, em alguns casos, protocolo de substâncias dopantes.

Percebendo a falta de disponibilidade de técnicas de diagnóstico rápido e confiável, especialmente para medição do colesterol, Abraham *et al.*⁴⁵ relataram o desenvolvimento de bioeletrodos com base em óxido de grafeno reduzido funcionalizado com nanopartículas de ouro para a imobilização da enzima colesterol oxidase. Os eletrodos fabricados por meio da técnica de deposição eletroforética apresentaram uma capacidade de detecção sinergicamente aumentada para a determinação do colesterol livre. Também foi relatada a melhora na cinética para o sistema híbrido contendo a enzima, devido à diminuição do valor da constante de Michaelis-Menten (K_M de 0,005 mmol L⁻¹) quando comparada ao rGO e rGO contendo as nanopartículas de ouro. Além disso, a plataforma desenvolvida mostrou uma ampla faixa de concentrações na determinação de colesterol (0,65-12,93 mmol L⁻¹), mostrando um limite de detecção de 0,34 mmol L⁻¹ de colesterol livre. Além de uma melhor sensibilidade, de aumento

na capacidade de imobilização da enzima colesterol oxidase sobre o material híbrido de óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de ouro, da sua cinética rápida e ampla faixa de detecção, o sistema também apresentou seletividade e estabilidade apreciável.

Boujakhrou *et al.*⁴⁶ desenvolveram um novo derivado de grafeno solúvel em água, preparado a partir de óxido de grafeno por meio de uma modificação por dois processos. O óxido de grafeno foi inicialmente funcionalizado de maneira covalente com grupos epoxi com (3-glicidiloxipropil) trimetoxi-silano e, na segunda etapa, reticulado com quitosana. A superfície nanoestruturada foi utilizada como suporte para a imobilização covalente da enzima lacase por ligações cruzadas com glutaraldeído. O eletrodo enzimático foi aplicado para a determinação amperométrica de diferentes compostos fenólicos. Para catecol, ele exibiu excelente comportamento analítico, com um intervalo linear de resposta de 200 nmol L⁻¹ a 15 µmol L⁻¹, uma sensibilidade de 93 mA mol⁻¹ cm⁻², e baixo limite de detecção de 76 nmol L⁻¹. Os autores relataram que o biossensor enzimático apresentou uma elevada estabilidade quando armazenados a 4 °C sob condições secas e foi utilizado com sucesso para quantificar os compostos fenólicos totais em amostras de chá comerciais à base de plantas.

Nos dois casos apresentados anteriormente, fica evidente a eficiência desses sensores eletroquímicos baseados em grafeno, pois podem ser desenvolvidos em diversas formas (compósitos, filmes, blendas, etc), apresentam alta sensibilidade, possibilitam a imobilização de diversos tipos de modificadores e exibem propriedades eletrocatalíticas, que não são tão evidentes em outros materiais à base de carbono como os eletrodos de diamante dopado com boro, carbono vítreo, pirolítico e o pó de grafite.

1.4 Interferentes endócrinos (EDs)

Interferentes endócrinos (ED) são uma classe de substâncias que vêm sendo descartada indiscriminadamente no meio ambiente. Tais contaminantes são substâncias que interferem no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos. Os EDs podem ser de origem sintética (xenoestrogênio) ou de origem natural como os hormônios humanos⁴⁷, bem como os fitoestrogênios, substâncias de origem vegetal. EDs também podem ser definidos com base nos seus efeitos no organismo, onde mesmo em baixas concentrações são capazes de alterar o funcionamento natural do sistema endócrino podendo causar diferentes tipos de câncer, além de prejudicar os sistemas reprodutivos dos seres afetados⁴⁸. São relatadas associações envolvendo a presença destas substâncias no organismo

humano e o surgimento de algumas doenças como os cânceres de testículo, de mama e de próstata, a queda da taxa de espermatozóides, deformidades dos órgãos reprodutivos, disfunção da tireóide e alterações relacionadas com o sistema neurológico ⁴⁹.

Na última década, tanto nos países europeus como nos Estados Unidos, as pesquisas nesta área começaram a se intensificar, com a finalidade de identificar as principais fontes contaminantes, determinar os mecanismos de ação destas substâncias no sistema endócrino de animais e seres humanos e, principalmente, desenvolver metodologias para a quantificação, identificação e remoção destas substâncias. No Brasil, discussões e pesquisas sobre os EDs começaram a ganhar relevância nos últimos anos. Todavia, descartes indiscriminados de interferentes endócrinos em amostras de águas naturais continuam sendo relatados. Um exemplo foi o ocorrido na região na bacia do rio Atibaia ⁵⁰, na qual diversos compostos com alto poder de interferência endócrina foram encontrados. Dentre estes podemos citar: hormônios sexuais, esteróides derivados do colesterol, resíduos da indústria farmacêutica como diclofenacos, cafeína, além de subprodutos industriais com alto potencial em interferência endócrina como bisfenol A, bisfenilas cloradas e ftalatos ⁵¹. Situação similar foi observada em uma bacia situada no Rio de Janeiro. Segundo o relato ⁵², concentrações do hormônio β -estradiol e alguns de seus derivados foram identificados, sendo o teor encontrado suficiente para gerar distúrbios no sistema endócrino de seres humanos e provocar a feminilização em uma população de peixes.

A determinação de interferentes endócrinos torna-se importante, visto que estas espécies estão envolvidas em muitos processos bioquímicos importantes e, por isto, devem ser monitoradas como analitos no campo de (bio)marcadores de doenças em humanos. No entanto, os métodos utilizados em laboratórios clínicos para esta determinação, baseiam-se geralmente na aplicação de metodologias de radioimunoensaio e de tipo ELISA, que têm alguns inconvenientes, tais como a falta de sensibilidade e precisão das medições, tempo de análise prolongada e o elevado consumo de reagentes, assim como a geração de rejeitos contaminados de difícil tratamento e descarte. Além disso, a determinação destas espécies também interessa à área de medicina esportiva, porque alguns hormônios são administrados em práticas dopantes ilegais, sendo substâncias capazes de melhorar o desempenho físico e resistência ao estresse, ou para aumentar a massa muscular. No controle destas práticas se utilizam principalmente técnicas cromatográficas com detecção por espectrometria de massas (GC/MS ou LC/MS). Estas técnicas garantem a identificação de substâncias proibidas na urina ou sangue, já que são capazes de detectar e quantificar concentrações muito baixas

destes analitos de interesse. No entanto, eles sofrem grandes inconvenientes: apresentar um custo de investimento e manutenção dos instrumentos muito elevados, falta de portabilidade, devem ser necessariamente utilizados em laboratórios de controle analítico. Com isso, o tempo de análise, que muitas vezes é uma prioridade, fica comprometida. Em nome da rapidez e simplicidade, sempre que possível, a amostra deve ser analisada diretamente, sem a necessidade de um tratamento prévio. Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para a obtenção de resultados confiáveis e um alto grau de precisão para aumentar a eficácia das técnicas e metodologias, em respeito aos requisitos essenciais: velocidade, precisão e alta sensibilidade.

1.5 17 β -Estradiol (E2)

Dentre os hormônios com ação estrogênica, pode-se citar o β -estradiol, o qual é produzido naturalmente pelos ovários e tem como função regular a ovulação e a menstruação, garantir a manutenção da gravidez e influenciar no crescimento dos órgãos reprodutivos. Entre seus derivados sintéticos o 17 β -estradiol é muito produzido (já que a substância está presente em pílulas anticoncepcionais) e seu efeito em diferentes animais foi investigado, mostrando que em pássaros e peixes ocorre desenvolvimento anormal da função da tireóide, diminuição da fertilidade e alterações sexuais e imunológicas, sendo os três últimos observados também em crustáceos e répteis. Já em humanos, há indícios de que o 17 β -estradiol causa desenvolvimento de câncer de mama e de próstata, redução de fertilidade masculina, má formação congênita em crianças, entre outros^{53; 54}.

Mesmo sem compreender completamente o efeito dos interferentes endócrinos nos organismos vivos, estão ocorrendo à produção e descarte em grande escala dessas substâncias, apesar dos órgãos responsáveis pelo tratamento de resíduos (estações de tratamento de água e efluentes) ainda não dispõem de métodos eficientes e baratos para a sua detecção e remoção. Estes interferentes, como por exemplo, 17 β -estradiol (β -estradiol ou E2), são substâncias químicas que, mesmo em baixas concentrações, são capazes de alterar o funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais e seres humanos, podendo causar diferentes tipos de mau funcionamento do organismo, inclusive câncer⁴⁸.

O impacto ambiental que os interferentes endócrinos ocasionam pode ser exemplificado nos estudos realizados em uma população de crocodilos presentes no lago Apopka, localizado na Flórida, Estados Unidos. Guillette *et al.*⁵⁵ detectaram elevadas

concentrações de estrogênios (hormônios femininos) e observaram que a população de crocodilos fêmeas possuía uma concentração de estrogênio no plasma duas vezes maior do que o normal, como consequência foi constatado a presença de ovários anormais além de alta taxa de mortalidade. Na população de crocodilos machos, foi observado que o nível de testosterona encontrava-se três vezes menor do que o normal, o que acarretou em diminuição dos órgãos sexuais e como consequência uma diminuição na taxa de reprodução da população de crocodilos.

Após o caso do lago Apopka, tanto os países europeus⁵³ como os Estados Unidos⁵⁴ e Japão⁵⁶ intensificaram as pesquisas nesse tema objetivando identificar e determinar mecanismos de ação e desenvolver metodologias analíticas para o monitoramento de interferentes endócrinos. No Brasil, um estudo realizado na região metropolitana de Campinas, monitorou 21 compostos dentre hormônios sexuais, esteróides e subprodutos industriais, todos com alto potencial em interferência endócrina. Em amostras de água potável foram identificadas progesterona, cafeína, colesterol, os hormônios estradiol e etinilestradiol, além de substâncias utilizadas como analgésicos, anti-inflamatórios e antitérmicos^{57; 58}. Situação similar foi observada na bacia do rio Paraíba do Sul⁵⁹, no estado do Rio de Janeiro, detectou-se concentrações do hormônio estradiol suficiente para gerar distúrbios no sistema endócrino de seres humanos e provocar a feminilização em uma população de peixes. Entretanto o mecanismo de ação dessas substâncias em organismos vivos é extremamente complexo e está relacionado com a função e comportamento de cada interferente individual. Esses interferentes, como discutidos no tópico anterior, podem ser de origem sintética (xenoestrogênio) ou de origem natural (fitoestrogênios) ou mesmo hormônios humanos⁴⁷. Eles ainda podem exibir tanto um comportamento estrogênico como androgênico. Estrogênios são esteróides hormonais que regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e suas funções reprodutivas. Já os androgênios são esteróides hormonais responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas.

A principal rota de entrada dos estrogênios naturais no meio aquático é através da excreção de animais (principalmente os humanos), visto que as estações de tratamento de efluentes não estão preparadas para retenção/remoção/eliminação desses contaminantes. Assim, a bioacumulação de 17 β -estradiol no meio ambiente torna-se um grande problema a ser resolvido. Desta forma, diferentes métodos analíticos são relatados para a determinação de 17 β -estradiol, tais como: HPLC⁶⁰, LC⁶¹, LC-MS⁶², além do teste ELISA⁶³. Os métodos

eletroquímicos para a detecção direta do 17 β -estradiol são baseados na reação de oxidação do grupo fenol, como mostrado na **Figura 2**.

Figura 2. Breve mecanismo de oxidação do 17 β -estradiol.

Fonte: Autoria própria.

No entanto, foi relatado que este processo eletroquímico apresenta uma baixa resposta de corrente sobre superfícies como platina, carbono vítreo, ouro e diamante dopado com boro. Como consequência, vários estudos relatam a utilização de modificadores de superfície a fim de aumentar a resposta eletroquímica do 17 β -estradiol. Um material promissor foi desenvolvido, caracterizado e aplicado para a determinação eletroquímica deste interferente endócrino. Este material foi baseado em um híbrido composto por grafeno ⁶⁴.

Wen *et al.* ⁶⁵ desenvolveram um sensor eletroquímico molecularmente impresso (MIES), preparado usando óxido de grafeno reduzido (rGO) combinado com nanopartículas de platina (PtNPs). Um monômero funcional foi utilizado para a formação da ligação Pt-S, e então, o ácido 6-mercaptonicotínico (MNA) foi formado na superfície do compósito PtNPs/rGO. Posteriormente, a superfície de um eletrodo de carbono vítreo foi modificada pela imobilização do hormônio 17 β -estradiol pela formação de ligações de hidrogênio com o MNA. Os filmes finos de polímero foram formados por eletropolimerização de MNA e as cavidades de reconhecimento específicas foram formadas após a remoção dos templates formados pelo hormônio. Usando a voltametria de pulso diferencial (DPV), o sensor resultante apresentou boas faixas lineares que variaram: 0,004 – 0,060 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (I_p (μA) = 57,872 C ($\mu\text{mol L}^{-1}$) + 1,6678, R = 0,9977) e 0,060–50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (I_p (μA) = 0,7915 C ($\mu\text{mol L}^{-1}$) + 6,6906, R = 0,9957). O limite de detecção encontrado para o 17 β -estradiol foi de 0,002 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, MIES foi utilizado com sucesso na análise de 17 β -estradiol em maquiagens com boas recuperações (> 91,9%) com RSD inferiores (< 3,8%). Os resultados revelaram que a combinação de polímeros molecularmente impressos com compósitos

PtNPs/rGO poderia ser aplicada para a determinação sensível e seletiva em concentrações baixas de 17 β -estradiol em matriz complexa.

Moraes *et al.*⁶⁶ desenvolveram um material para a determinação eletroquímica de 17 β -estradiol utilizando um eletrodo à base de óxido de grafeno reduzido e um complexo de metal de porfirina aplicado para monitorização ambiental. O perfil eletroquímico do eletrodo proposto foi analisado por voltametria de pulso diferencial, que mostrou uma mudança da oxidação potencial de pico de 17 β -estradiol de 150 mV em uma direção menos positiva em comparação com o eletrodo de óxido de grafeno reduzido sem a modificação da porfirina. Os autores realizaram análises por voltametria de pulso diferencial para determinar o hormônio 17 β -estradiol, sem qualquer etapa prévia de extração, de limpeza ou derivatização, na faixa de concentrações de 0,1-1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um limite de detecção obtido de 5,3 nmol L^{-1} (1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$). O sensor proposto foi aplicado com sucesso na determinação de hormônio 17 β -estradiol em amostra de água de rio, sem qualquer etapa de purificação e foi analisada pelo método de adição de padrão.

Lintong *et al.*⁶⁷ prepararam a superfície de carbono vítreo com grafeno, que foi facilmente preparado através de uma etapa de esfoliação, utilizando N-metil-2-pirrolidona como solvente e, em seguida, utilizada para construir um sensor eletroquímico para a determinação de traços de dietilestilbestrol (DES) e 17 β -estradiol (E2). Na superfície do filme de grafeno preparado, dois processos de oxidação independentes e bastante-aumentados foram observados em 0,28 V e 0,49 V para o DES e E2. Os aumentos notáveis no sinal analítico indicaram, neste caso, que a sensibilidade de detecção foi melhorada significativamente. Foram discutidas as influências do valor do pH, quantidade de grafeno e acumulação de tempo sobre os sinais de oxidação de DES e E2. Como resultado, um método eletroquímico altamente sensível e rápido foi desenvolvido para a determinação simultânea de DES e E2. Os valores do limite de detecção foram avaliados em 10,87 nmol L^{-1} e 4,9 nmol L^{-1} para DES e E2, respectivamente. Além disso, este novo método foi utilizado com sucesso em amostras ambientais (água de um lago) e a precisão foi satisfatória.

1.6 Estriol (E3)

O hormônio estriol foi isolado pela primeira vez em 1930 a partir da urina humana durante o período de gravidez, independentemente, por Doisy *et al.* ⁶⁸. O estriol foi convertido em estrona, o primeiro hormônio sexual feminino isolado, por desidratação sob vácuo com bissulfato de potássio. O estriol pode ser extraído da urina por uma solução aquosa de hidróxido de sódio a partir de etanol ou benzeno, devido à sua maior solubilidade tanto em água (embora ainda praticamente insolúvel) e ligeiramente maior acidez, em comparação com os outros hormônios femininos. As propriedades, provavelmente, são responsáveis pelo fato de que o estriol é de valor para a terapia oral, enquanto estrona e β -estradiol não são. O estriol pode ser sintetizado a partir de estrona a mais facilmente obtida por um processo desenvolvido de forma independente por Fieser *et. al.* ⁶⁹.

Estriol (1,3,5, (10) -estratrieno-3,16 α , 17 β -triol) (**Figura 3**) é um dos estrogênios esteroides essenciais que apresentam um impacto crítico sobre o funcionamento sexual e reprodutivo, estrutura óssea e alguns órgãos.

Figura 3. Estrutura química do hormônio estriol.

Fonte: Autoria própria.

O estriol é encontrado como poluente em águas ambientais e é membro de uma classe de substâncias químicas conhecidas como interferentes endócrinos que têm efeitos adversos por interferir com a função de hormônios no corpo humano e em organismos aquáticos ^{70; 71}. Estes interferentes endócrinos podem persistir após os tratamentos de purificação de água e mesmo em baixas concentrações potencialmente podem causar efeitos biológicos. O acompanhamento do estriol no ambiente aquático está se tornando progressivamente uma

prioridade para o governo e agências reguladoras, bem como o público em geral. Assim, o desenvolvimento de estratégias modernas de análise para medir esses poluentes em baixos níveis de concentração é muito importante.

A quantificação de estriol tem sido proposta utilizando vários métodos e técnicas, incluindo cromatografias ^{72; 73; 74}, imunoensaios ^{75; 76; 77}, eletroforese ^{78; 79}, e métodos eletroanalíticos ^{70; 80; 81}. Devido à sua simplicidade operacional, baixo custo, resposta rápida, de alta sensibilidade, potencialidade para a miniaturização e automação, e monitoramento no local e em tempo real, o método eletroanalítico é de grande interesse.

Zhu *et al.* ⁸² desenvolveram um novo sensor eletroquímico baseado na eletrodeposição de um compósito baseado em carbono mesoporoso ordenado (OMC) e grafeno (GR), sobre a superfície de um eletrodo de pasta de carbono (CPE), denominado pelos autores (GR/OMC/CPE). O eletrodo foi preparado para a determinação quantitativa de estrogênios naturais por voltametria de onda quadrada (SWV). O eletrodo modificado com o compósito eletrodepositado foi preparado com um eletrodo de pasta de carbono, a partir de varreduras cíclicas na faixa de potencial de -0,8 a +2,4 V em 0,1 mg mL⁻¹ OMC e GR. Os comportamentos eletroquímicos de estrogênios no sensor desenvolvido foram investigados por voltametria cíclica, e os resultados mostraram que o eletrodo de pasta de carbono modificado exibiram excelente atividade eletrocatalítica para a oxidação de estrogênios naturais envolvendo estrona, estradiol e estriol. SWV foi usado para a determinação quantitativa de estrogênios. Nas condições otimizadas, a resposta da corrente foi linearmente proporcional à concentração de estriol na faixa de $5,0 \times 10^{-9}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com um baixo limite de detecção de $2,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O sensor proposto foi aplicado com sucesso para analisar os níveis de hormônio em amostras de soro obtidas a partir de mulheres.

Tian *et al.* ⁸³ desenvolveram novas microesferas magnéticas como material adsorvente de estrogênios. As microesferas foram preparadas por revestimento de partículas de Fe₃O₄, com um composto feito a partir de dióxido de titânio e óxido de grafeno (Fe₃O₄@TiO₂/GO). As esferas foram carregadas para um chip contendo um fluxo microfluídico e utilizadas para adsorver a estrona (E1), β-estradiol (E2) e estriol (E3). Os hormônios foram então eluídos a partir das microesferas com metanol e submetido às determinações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Com os parâmetros otimizados, o limite de detecção para o estriol variou na faixa de 4,3-7,5 ng mL⁻¹, e os valores encontrados na recuperação foram de 70,6% a 94,5%. Os desvios padrão relativos intra dia e inter dia obtidos foram inferiores a 2,5% e

3,2%, respectivamente. Os resultados indicaram que o método foi aplicado com sucesso na determinação de hormônios em amostras de leite e leite em pó.

Luo *et al.*⁸⁴ desenvolveram um filme de carbono mesoporoso ordenado com L-prolina de espessura controlável sobre a superfície de eletrodo de carbono vítreo. Foi utilizada a técnica eletroquímica tanto na síntese quanto na construção da plataforma de detecção eletroquímica de hormônios naturais. Os comportamentos voltamétricos de hormônios envolvendo estradiol, estrona e estriol foram investigados sobre o eletrodo modificado, e exibiu forte atividade eletrocatalítica para a oxidação dos três estrogênios especialmente para estriol, tornando-se uma plataforma de detecção eletroquímica promissora para a detecção sensível de estrogênios. Nas condições ótimas, a faixa linear de estriol obtida por voltametria de onda quadrada foi de $1,0 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com um baixo limite de detecção de $5,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. O eléctrodo modificado, desenvolvido também foi aplicado para a determinação do hormônio em soros de sangue do sexo feminino com resultados satisfatórios.

Capítulo 2 – Objetivos

O trabalho experimental deste projeto de doutorado foi realizado nos laboratórios do Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME) da Universidade de São Paulo e nos laboratórios do Grupo de Eletroanálises e (Bio)sensores Eletroquímicos da Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Complutense de Madrid. Os objetivos propostos estão apresentados nos projetos de pesquisa financiados e mantidos pelo grupo GMEME durante o tempo de realização dos experimentos, em particular os projetos de pesquisa de doutorado FAPESP (2012/18339-1) e doutorado no exterior (Madri – Espanha) FAPESP (2014/02457-0). Nesses projetos se expressava o interesse no desenvolvimento de sensores baseados em nanomateriais (bio)compatíveis para a detecção de substâncias endócrinas, assim como de novas estratégias na preparação de sensores, biossensores e imunossensores eletroquímicos para sua aplicação na determinação de hormônios e substâncias endócrinas como vitaminas, dopamina, epinefrina e noradrenalina. Foi proposta a construção de plataformas sensoras sensíveis e seletivas para determinação destas espécies, que permitiram desenvolver métodos analíticos competitivos com os procedimentos utilizados atualmente, para isto, objetivou-se:

- Desenvolver um sensor eletroquímico baseado em *quantum dots* suportado em óxido de grafeno para a determinação de 17β -estradiol;
- Desenvolver um biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de ródio suportadas em óxido de grafeno reduzido para a determinação de 17β -estradiol;
- Desenvolver um sensor eletroquímico com base em óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de antimônio para a determinação do hormônio estriol;
- Desenvolver um nanomaterial híbrido baseado em grafeno, Sb_2O_5 e lacase para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico na determinação de estriol;

Ainda que a preparação e otimização dos eletrodos sejam diferentes entre si, existem aspectos comuns relacionados entre os experimentos. Estes aspectos podem se resumir em estudar os parâmetros de repetitividade, reprodutibilidade, estabilidade e seletividade, além de se realizar a aplicação em amostras reais clínicas e/ou ambientais.

Capítulo 3 – Experimental

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica. Na **Tabela 1** encontram-se listados os reagentes utilizados e a procedência.

Tabela 1. Reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Reagentes	Procedência
nitrato de sódio	Sigma-Aldrich
acetato de sódio	JT Baker
fosfato de sódio dibásico	Sigma-Aldrich
fosfato de sódio monobásico	Sigma-Aldrich
permanganato de potássio	JT Baker
peróxido de hidrogênio	Sigma-Aldrich
dimetilformamida	Sigma-Aldrich
$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma-Aldrich
$K_4[Fe(CN)_6]$	Sigma-Aldrich
17 β -estradiol	Sigma-Aldrich
estriol	Sigma-Aldrich
ethinilestradiol	Sigma-Aldrich
Laccase from <i>Trametes versicolor</i> (EC 1.10.3.2, 10 U/mg)	Sigma-Aldrich
tionina	Sigma-Aldrich
cloreto de ródio	Sigma-Aldrich
cloreto de antimônio	Merck
polietilenoglicol	Sigma-Aldrich
borohidreto de sódio	Sigma-Aldrich
glutaraldeido	Sigma-Aldrich
dodecil sulfato de sódio	Sigma-Aldrich
grafite em pó (<20 microns)	Sigma-Aldrich
óxido de cádmio	Sigma-Aldrich
ácido n-tetradecilfosfonico	Sigma-Aldrich
octadeceno	Sigma-Aldrich

telúrio em pó (200 mesh)	Sigma-Aldrich
ácido sulfúrico	Merck
ácido nítrico	Merck
ácido fosfórico	Merck
ácido acético	Merck
hexano	JT Baker
isopropanol	JT Baker
butanol	Sigma-Aldrich
etanol	Sigma-Aldrich
acetona	JT Baker

Todas as soluções foram preparadas com água purificada em um sistema Millipore Milli-Q (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

3.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas (voltametria cíclica, voltametria linear, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, cronoamperometria) foram realizadas em um potenciostado/galvanostato modelo PGSTAT 302 (Autolab Holanda) acoplado a um computador HP e controlado pelo software NOVA e GPES 4.7 (Autolab, Holanda). O mesmo equipamento, equipado com o módulo que permite a realização de análises de espectroscopia de impedância eletroquímica, foi utilizado para a aquisição de resultados, controlado pelo software FRA2 (Ecochemie), no estudo da resistência eletrônica dos diferentes compostos sintetizados.

Para as medidas de amperométricas foi utilizado um potenciostato portátil de dois canais InBea (InBea Biosensores, Espanha).

As caracterizações morfológicas foram avaliadas utilizando microscópio eletrônico de transmissão (*Zeiss EM912 Omega e STEM*). Para preparar as amostras, uma pequena quantidade do pó foi disperso em dimetilformamida anidro (Sigma-Aldrich) em banho de ultrassom. A dispersão preparada foi em seguida gotejada sobre uma *grid* de cobre. A distribuição de tamanho de partículas de CdTe foi determinada por dispersão de luz dinâmica (*dynamic light scattering*, DLS), utilizando o equipamento *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern, EUA).

Os espectros de absorção de UV-Vis foram realizados utilizando o equipamento *Jasco V- 630* (*Jasco INC, EUA*) espectrômetro configurado com uma largura de fenda de 2 nm , uma velocidade de 4 nm por segundo e um intervalo de 1 nm de dados. As propriedades de fotoluminescência dos *quantum dots* foram medidas utilizando um espectrofluorímetro *QM-4/2005* (*Photon Technology International , Birmingham , EUA*).

A caracterização estrutural foi realizada utilizando difração de raios-X (*Rigaku Rotaflex Diffractometer RU200B*) a 50 kV e 100 mA, com um (CuK α) comprimento de onda de radiação de 1,542 Å. A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foi realizada para obter informações sobre a superfície e a natureza das ligações químicas do grafeno oxidado. O equipamento utilizado foi (*VSW HA 100* - analisador de energia de elétrons hemisférico), anodo de Al como fonte de raios –X. A fonte de raios-X foi operada a 12 KeV e 15 mA.

Espectros de espalhamento Ramam foram realizados por meio de um espectrômetro Ramam (*Renishaw 2000*) com detector CCDS e um filtro holográfico (*Renishaw Ltd., Reino Unido*). Para complementar a caracterização estrutural do grafeno oxidado, foram realizadas medidas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (espectrofotômetro de FT-IR – *Bomem – MB102, USA*).

Microscopias de força atômica (AFM) foram realizadas com um microscópio multi-modos SPM Nanoscope IIIa (Veeco Instruments Inc., EUA).

As análises de infra-vermelho (FT-IR) foram adquiridos com um espectrômetro Nicolet Nexus 670/870 (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

Para as análises cromatográficas, foi utilizado um HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) sistema modular DGU-14A acoplado a duas bombas LC-10A, um forno CTO-10A, e um detector de comprimento de onda variável SPD-10AV. As separações foram realizadas numa coluna de HPLC Ascentis C-18 (25 cm x 4,6 mm, id: 5 μ m), protegido por uma coluna de guarda Ascentis C-18 (2 cm x 4,0 milímetros, ID: 5 μ m), eluída com um mistura de álcool metílico, água e ácido fórmico (65:35:0,2 v/v) com uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ sob condições isocráticas. O comprimento de onda monitorado foi de 280 nm.

Outros equipamentos utilizados foram:

- pH-metro Qualxtron modelo 8010, calibrado de forma usual com solução padrão (tampão comercial pH 4,0, 7,0 e 9,0 a 25,0 $\pm$ 0,5 °C).
- Banho de ultrassom (Soni-tech) com opção de controle de frequências de ultrassom.
- Agitador Vortex (Phoenix).

- Agitadores magnéticos (Fisatom) com controle de rotação e aquecimento.
- Mufla (Qulxtron) com regulagem de temperatura de até 200 °C.
- Forno (SPLabor modelo SP-1200) com regulagem de temperatura de até 1200 °C.
- Centrífuga de eppendorf com capacidade para (Eppendorf modelo 5427 R) equipada com controle de temperatura.
- Centrífuga (Thermo Scientific modelo ST 16) 8 tubos com capacidade de 100 ou 150 mL de volume cada tubo.
- Balança analítica (Shimadzu).
- Balança semi-analítica (Shimadzu).

3.3 Célula eletroquímica

Todas as medidas foram realizadas em uma célula de vidro com capacidade total de 20,0 mL possuindo entrada para três eletrodos, com borbulhamento e saída de gás.

3.4 Eletrodos

3.4.1 Eletrodos de referência

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando como eletrodo de referência: Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L⁻¹.

3.4.2 Eletrodo auxiliar

O eletrodo auxiliar utilizado nas medidas eletroquímicas foi uma placa de platina de 1,0 cm² de área, soldado a um fio de cobre para contato elétrico. O conjunto foi fixado em um tubo de vidro ($\phi = 5$ mm) e foi preenchido com resina epóxi (Silaex).

3.4.3 Eletrodos de trabalho

Foram utilizados como eletrodos trabalhos os eletrodos de carbono vítreo recobertos com filmes de materiais compósitos a base de grafeno e modificadores que serão discutidos posteriormente.

3.4.4 Preparação dos eletrodos

Inicialmente foi realizada uma etapa de limpeza e condicionamento do eletrodo de disco de carbono vítreo (GC) ($\phi = 3,0$ mm). A limpeza consistiu em polimento do eletrodo em suspensão de alumina $0,5\ \mu\text{m}$, seguido de banho de ultrassom em etanol por cinco minutos e em água ultrapura por cinco minutos. O eletrodo GC polido e limpo foi imerso em solução tampão fosfato $0,1\ \text{mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,0$, foi aplicado um potencial de $+1,5\ \text{V}$ por sessenta segundos, seguido por aplicação de um potencial $-1,5\ \text{V}$ vs. Ag/AgCl por sessenta segundos. Finalmente, foram feitos ciclo voltamogramas entre os potenciais de $-1,0\ \text{V}$ e $+1,0\ \text{V}$ vs. Ag/AgCl, com velocidade de varredura de $100\ \text{mV s}^{-1}$ até obter um voltamograma cíclico reprodutível.

Capítulo 4 – Procedimentos Experimentais

4. Procedimentos experimentais

4.1 Síntese de óxido de grafeno (GO)

A síntese de grafeno a partir de grafite foi realizada de acordo com o método de Hummer²³ com algumas modificações: 1,0 g de grafite e 1,0 g de NaNO₃ foram dispersas em 46 mL de H₂SO₄ concentrado, e a mistura foi deixada num banho de gelo sob agitação até que se atingiu uma temperatura de 20 °C. Em seguida, 6,0g de KMnO₄ foram adicionados lentamente, sob agitação vigorosa. A mistura de reação foi, em seguida, mantida em gelo a 0 °C durante 24 h. Após este tempo, a solução foi diluída com 240 ml de água, sob agitação e a temperatura foi elevada para 98 ° C durante 1 h; em seguida, 85 mL de H₂O₂ (30% v/v) foram adicionados. O produto foi filtrado a quente e lavado três vezes com uma solução de HCl (5% v/v). Em um passo final, o material obtido foi seco a 50 °C durante 48 h, obtendo-se assim o grafeno oxidado (GO).

4.2 Síntese de óxido de grafeno reduzido (RGO)

A síntese de óxido de grafeno reduzido (RGO) foi realizada a partir do óxido de grafeno previamente sintetizado (descrito na sessão 4.1). Uma suspensão contendo 3mg de GO foi preparada em 5 mL de água e, em seguida, submetida a ultrassons durante 20 min. Um excesso de borohidreto de sódio foi então adicionada, e esta suspensão foi sonicada durante mais 20 min. O RGO obtido foi centrifugado durante 10 min a 3000 rpm e lavado várias vezes com água destilada até que a solução se tornou incolor. Em seguida, o RGO foi seco a 60 °C.

4.3 Síntese de quantum dots de telureto de cádmio

A síntese de quantum dots (QDs) de telureto de cádmio (CdTe) foi realizada baseando-se no procedimento proposto por Yu *et al.*⁸⁵. Para isso, 25,6 mg de CdO foi misturado com 114,0 mg do ácido n-tetradecilfosfônico (TDPA) e 7,8 g de 1-octadeceno (ODE). A mistura foi aquecida e agitada vigorosamente em atmosfera de argônio, na qual o aspecto da solução permaneceu incolor. Após esta etapa de aquecimento, 12,5 mg de Te foi dissolvido em 475 mg de tributilfosfina (97%) e 1,5 g de ODE. A solução foi preparada em uma *glove-box* com atmosfera de argônio. Em seguida, utilizando uma seringa, a mistura contendo Te foi rapidamente adicionada no frasco reacional contendo a solução de Cd. Manteve-se a temperatura constante em 260 ° C para o crescimento dos nanocristais, durante 5 minutos.

Observou-se a mudança de coloração da solução para laranja, cor característica deste tipo de QDs. Utilizando novamente uma seringa, a mistura foi retirada do frasco reacional e rapidamente adicionada a 5 mL de hexano desairado e a temperatura de 5 ° C.

Para o isolamento e purificação dos nanocristalitos, uma alíquota de 10 mL da suspensão de CdTe foi adicionada em 20 mL de metanol anidro, promovendo uma floculação reversível dos nanocristais. Os QDs foram separados por centrifugação. A seguir, os nanocristais foram dispersos em 25 mL de 1-butanol anidro, seguido por centrifugação, resultando numa solução opticamente clara de nanocristais, e um precipitado cinzento foi descartado. A fim de eliminar os produtos que não reagiram, adicionou-se 25 mL de metanol anidro, para produzir outra floculação de nanocristais. Finalmente, lavou-se novamente a suspensão com 50 mL de metanol, seguido por secagem a vácuo.

4.4 Preparação e imobilização do material híbrido a base de óxido de grafeno e quantum dots de telureto de cádmio (GO/CdTe) sobre o eletrodo de carbono vítreo

Para o preparo do material híbrido a base de óxido de grafeno e *quantum dots* de telureto de cádmio (GO/CdTe), foram utilizados 1,0 mg de óxido de grafeno e 0,5 mg de CdTe suspensos em 1,0 ml de dimetilformamida (DMF). A suspensão foi dispersa com agitação ultrassônica durante 1 h. Uma alíquota de 15 µL desta suspensão foi gotejada sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) e o solvente foi em seguida evaporado à temperatura ambiente. O solvente DMF foi escolhido porque mostrou-se ser mais compatível do que outros solventes estudados (etanol, acetona, DMSO), por causa do carácter hidrofóbico, o que permite a fabricação de filmes altamente estáveis.

4.5 Síntese de óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de ródio (RGO-RhNP) e preparo do eletrodo contendo enzima lacase (Lac/rGO-RhNP/GCE)

O material nanocompósito foi preparado pela dispersão de 500 mg de GO e 500 mg de RhCl₃ em 50 mL de água duplamente destilada por tratamento de ultrassons durante 30 min. A mistura foi aquecida até à ebulição sob agitação magnética constante, e, em seguida, 750 µL de 1% (m / v) de solução de citrato de sódio foram adicionados. A mistura foi mantida em ebulição durante 5 min e, em seguida, 100 mg de NaBH₄ em 5 mL de água foram adicionados. A mistura foi agitada sob aquecimento durante outros 30 min, em seguida arrefecida até à temperatura ambiente e filtrada. O sólido resultante foi lavado repetidamente com água e etanol e seco sob vácuo à temperatura ambiente.

Para o preparo do eletrodo de carbono vítreo (GCE), primeiramente a superfície foi recoberta com RGO-RhNP por deposição de 10 μL de uma dispersão aquosa de 0,5 mg/mL do nanocompósito na superfície do eletrodo e seco em temperatura ambiente. A enzima lacase foi imobilizada sobre a superfície do eletrodo contendo o material nanoestruturado por deposição de 10 μL de uma solução de 6,6 mg/mL de enzima em tampão fosfato de sódio 100 mmol L^{-1} , pH 7,0. Posteriormente, foi adicionada uma alíquota de 10 μL de 3% (v/v) de solução de glutaraldeído. O eletrodo foi mantido a 4 °C durante 1 h, em seguida, lavou-se várias vezes com tampão frio de 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato de sódio, pH 7,0 e finalmente armazenado a 4 °C até sua utilização.

4.6 Síntese de óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de antimônio (RGO-SbNP) e modificação do eletrodo de carbono vítreo

A síntese do composto RGO-SbNP foi realizada utilizando dodecilsulfato de sódio (SDS) como surfactante. Uma suspensão contendo uma proporção em peso de 10:4 GO/SDS foi preparada em 15 mL de etanol e, em seguida, submetida a ultrassons durante 20 min. Um excesso de borohidreto de sódio foi então adicionada, e esta suspensão foi sonicada durante mais 20 min. Uma solução contendo 40% SbCl_3 em relação à quantidade de GO foi lentamente gotejada na solução RGO, que foi mantida sob agitação constante. Uma vez a reação completa, o composto RGO-SbNP foi disperso usando uma sonda de ultrassons durante 1h. O RGO-SbNP obtido foi centrifugado durante 10 min a 3000 rpm e lavado várias vezes com água destilada até que a solução se tornou incolor. Depois disso, 5mL de etanol foi adicionado ao composto resultante e, em seguida, o RGO-SbNP foi seco a 60 °C.

Para a modificação do eletrodo de carbono vítreo, uma suspensão de 0,3 mg de RGO-SbNPs disperso em 1,0 mL de água foi preparada usando ultrassom durante 20 min. Uma alíquota de 10 μL desta dispersão foi depositada sobre a superfície do eletrodo do GC, que foi seco à temperatura ambiente.

4.7 Síntese do nanomaterial híbrido baseado em $\text{GO/Sb}_2\text{O}_5$ e preparo do biossensor enzimático Lac/ $\text{GO/Sb}_2\text{O}_5$

Para preparar o nanomaterial híbrido $\text{GO/Sb}_2\text{O}_5$, 80 mg de GO, 10 mg SbCl_3 e 8 mg de dodecil sulfato de sódio foram misturados em 40 mL de CCl_4 sob atmosfera de argônio. A mistura foi agitada durante 20 minutos e depois 2 mL de $1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NaBH_4 foram

adicionados. A mistura foi submetida a refluxo a 70°C durante 2 h, em seguida filtrada e lavada três vezes com CCl₄. O nanomaterial resultante foi seco a 50°C durante 48 h.

Para o preparo do biossensor enzimático (Lac/GO/Sb₂O₅/GCE), a modificação do GCE polida foi realizada pela deposição de 10 µL de uma dispersão aquosa de 1,0 mg/mL de GO/Sb₂O₅ na superfície do eletrodo e seco a temperatura ambiente. A enzima foi ainda imobilizada sobre o eletrodo modificado depositando uma alíquota de 10 µL de 3,0 mg/mL de solução de lacase em tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹, pH 7,0, e mesclando-se com 10 µL de 3% (v/v) de glutaraldeído. O eletrodo foi mantido a 4°C durante 1 h, depois foi lavado várias vezes com tampão fosfato frio, e finalmente armazenado a 4°C até a utilização.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

5.1 Sensor eletroquímico baseado em *quantum dots* suportado em óxido de grafeno para a determinação de 17 β -estradiol

O nanomaterial baseado em *quantum dots* de telureto de cádmio suportado sobre a superfície de grafeno oxidado foi utilizado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para determinação do hormônio 17 β -estradiol. Os materiais e o nanohíbrido foram sintetizados e caracterizados com sucesso utilizando as técnicas de microscopia de transmissão eletrônica, dispersão de luz dinâmica (*dynamic light scattering*), espectrofotometria de ultravioleta visível e fluorescência, espalhamento Raman, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, difração de raios-X, infravermelho e técnicas voltamétricas. Estas caracterizações mostraram claramente que partículas de telureto de cádmio possuem um tamanho médio de 3,10 nm e encontram-se suportadas sobre a superfície do grafeno oxidado. As propriedades eletrônicas do grafeno oxidado aliadas ao efeito fotoeletrocatalítico dos *quantum dots* mostraram grande eficiência na eletro-oxidação do hormônio 17 β -estradiol. Foram avaliados parâmetros experimentais, tais como o tipo de eletrólito suporte, pH, potencial e tempo de pré-tratamento, amplitude e potencial do pulso. O efeito sinérgico entre o grafeno oxidado e os *quantum dots* de telureto de cádmio forneceram valores para o limite de detecção do interferente endócrino 17 β -estradiol em níveis nanomolar, além de melhorar a reprodutibilidade e repetibilidade.

A síntese dos QDs (previamente descrita na *sessão 4.3*) foi avaliada utilizando a técnica de DLS (*Dynamic Light Scattering*). Os experimentos de DLS foram realizados para as suspensão de CdTe utilizando uma célula espectrofotométrica em meio de hexano. Para isso foi utilizada uma luz monocromática, proveniente de uma fonte de laser com o comprimento de onda a 250 nm. A luz incide nas partículas de QDs da suspensão e a quantidade de luz refratada pelas partículas é relacionada à distribuição dos tamanhos das partículas em função do tempo de flutuação da intensidade da dispersão. A **Figura 4** mostra a distribuição do tamanho de partícula como função da percentagem de intensidade de luz.

Figura 4. Medidas de DLS da distribuição dos tamanhos de partícula, utilizando luz monocromática em um comprimento de onda 250 nm.

Fonte: Cincotto, F. H. *et al*, 2014⁸⁶.

Os valores observados estão relacionados à média de três medidas das amostras de QDs (o desvio padrão obtido foi inferior a 5%). Observou-se que a distribuição do tamanho das partículas varia em um intervalo de 1,5 a 5,8 nm, com um valor máximo de distribuição observado em $3,2 \pm 0,2$ nm. Esta distribuição de tamanho está de acordo com a síntese QDs proposto por Algar *et al.*³⁶ nos quais os QDs possuem tamanho de partícula variando de 2,0 a 6,0 nm.

Na **Figura 5** estão apresentadas as fotos dos frascos com a solução dos nanocristais na ausência e na presença da irradiação de luz ultravioleta. Pode-se observar a fluorescência (emissão dos *quantum dots*) durante a excitação com a luz ultravioleta.

Figura 5. Frasco contendo *quantum dots* de CdTe na ausência (imagem à esquerda) e na presença da irradiação de luz ultravioleta (imagem à direita).

Fonte: Autoria própria.

As características ópticas dos QDs, tais como absorção e a fotoluminescência foram avaliadas utilizando medidas de UV-Vis e espectros de fluorescência, sendo apresentados na **Figura 6**. Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 2,5 mL em temperatura ambiente. Os espectros da suspensão CdTe foram obtidos em meio de hexano, para proporcionar as densidades ópticas adequadas para as medidas.

Figura 6. Espectros de absorção no UV-Vis (—) e fotoluminescência (o) da suspensão dos *quantum dots* de CdTe, com comprimento de onda de excitação em 400 nm.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2014⁸⁶.

Na **Figura 6** estão os espectros típicos de absorção UV-Vis e fotoluminescência dos nanocristais de CdTe. Para o espectro de UV-Vis, foi observado um máximo de absorção, bem definido, no comprimento de onda de 585 nm. Esta banda é atribuída à primeira transição eletrônica, e indica uma distribuição bem estreita nos tamanhos das partículas dos QDs de CdTe. O tamanho dos nanocristais está relacionado com a quantidade de energia absorvida no confinamento, que se desloca para valores de comprimento de onda mais elevados com o aumento do tamanho dos nanocristais. A fim de avaliar a distribuição de tamanho dos nanocristalitos, foi aplicado um método teórico baseado no máximo de absorção de UV-Vis. Este método foi relatado pela primeira vez por Yu *et al.*⁸⁵, na qual é mostrado um valor estimado do tamanho dos QDs. Este valor foi obtido a partir de ajustes não lineares de diversos espectros de UV-Vis, para diferentes tamanhos de CdTe. A relação entre o diâmetro das partículas (D) e o comprimento de onda de UV-Vis (λ) pode ser visualizada na seguinte equação:

$$D = (9,8127 \times 10^{-7}) \lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3}) \lambda^2 + (1,0064) \lambda - 194,84$$

O valor médio de D obtidos para medidas da suspensão de CdTe em $\lambda = 585$ nm foi de 3,11 nm. Este valor é concordante com os resultados obtidos pela técnica de DLS, mostrando que a etapa de síntese foi eficiente.

A observação da propriedade de fotoluminescência dos QDs foi realizada utilizando o espectro de emissão. Para o CdTe sintetizado neste trabalho, como é mostrado na **Figura 6**, o comprimento de onda máximo de emissão foi de 660 nm, com um comprimento de onda de excitação de 400 nm. A emissão é indicativa que o CdTe está em confinamento quântico associado com transições dos elétrons aprisionados entre as bandas de condução e valência. Comparando os resultados obtidos para a banda de emissão, isto é, 660 nm, e a energia correspondente de 1,88 eV com outros estudos reportados em literatura, observa-se que estes valores são bastante concordantes para um tamanho médio de partícula de 3,0 nm. Os tamanhos dos nanocristais definem as propriedades ópticas e espectroscópicas. Tipicamente, para partículas menores, as energias de luminescência são azuis deslocando-se para comprimentos de ondas maiores para energias mais elevadas. Além disso, as propriedades fotoluminescentes variam diretamente com o tamanho dos QDs, ou seja: pequenas partículas de QDs (1,2 nm) emitem no UV, QDs de tamanhos médios (1,5 a 3,0 nm) emitem no visível, e QDs grandes (3,8 nm) emitem no infravermelho próximo.

5.1.1 Caracterização morfológica do GO e do híbrido GO/CdTe

A caracterização morfológica do GO e do híbrido GO/CdTe foi realizada utilizando microscopia de transmissão eletrônica (TEM), como mostrado na **Figura 7**.

Figura 7. Imagem de TEM para as nanofolhas de grafeno oxidado. Detalhe: Espectro de Raman para as nanofolhas de grafeno oxidado.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2014 ⁸⁶.

Pode ser observado que as nanofolhas de GO se apresentam bem uniformes e com certo grau de transparência. No entanto, a diferença no grau de transparência sugere que a espessura das nanofolhas de GO é muito pequena. Outro ponto a salientar é que as nanofolhas não são compostas por uma única camada. Existem sobreposições de várias camadas individuais. Outra observação são as linhas escuras com grande contraste, o que ilustra claramente que nanofolhas de GO estão amassadas ou dobradas. Supõe-se que a morfologia rugosa pode reduzir a energia de superfície das nanofolhas de GO e, assim, produzir um GO mais estável. Neste sentido, o GO pode atuar como um suporte para a adsorção dos QDs.

A caracterização estrutural das nanofolhas agregadas de GO foi realizada utilizando a espectroscopia Raman. O detalhe da **Figura 7** apresenta um típico espectro de Raman para o GO. Observou-se no espectro de Raman duas bandas características de absorção: banda G em 1720 cm^{-1} e banda D em 1635 cm^{-1} . A banda G corresponde às ligações atribuídas aos carbonos sp^2 . A banda D está associada ao modo de vibração dos hexágonos de carbono dispostos no plano. Como mostrado no detalhe da **Figura 7**, a magnitude da banda D é devido à presença de defeitos na estrutura do grafeno proveniente de grupos funcionais, tais como: carboxilas, hidroxilas e epóxi. A relação entre a intensidade da banda D (I_D) e banda G (I_G) é normalmente utilizada para avaliar a dimensão dos domínios em sp^2 planar para materiais carbonáceos. O valor obtido para a relação I_D/I_G foi de 1,44 para as nanofolhas de GO. Este valor é consistente com outros valores descritos para nanofolhas de GO ⁸⁷.

Como um complemento da espectroscopia de espalhamento Raman foi realizada a espectroscopia na região do infravermelho, mostrado na **Figura 8**. Foi possível observar três bandas vibracionais referentes aos grupos funcionais inseridos nas folhas do grafeno.

Figura 8. Espectro de absorção na região do infravermelho para uma amostra de grafeno oxidado.

Fonte: Autoria própria.

A banda de absorção observada em 3410 cm^{-1} está relacionada à ligação do grupo hidroxila à estrutura das folhas de grafeno. A banda de absorção observada em 1718 cm^{-1} indica a formação de complexos de superfície de oxigênio e pode ser atribuída à vibração do tipo *stretching* (alongamento) do C=O. A banda de absorção observada em 1212 cm^{-1} está relacionada à vibração da ligação epóxi. A banda de absorção observada em 1575 cm^{-1} está relacionada com a dupla ligação entre carbonos, onde se caracteriza as ligações de caráter sp^2 . Estes grupos indicam que o sistema original do orbital π -conjugado (grafite natural) foi destruído, e que os grupos contendo oxigênio foram inseridos no esqueleto de carbono durante a oxidação do pó de grafite.

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foi realizada para obter informações sobre a superfície e a natureza das ligações químicas do GO. Na **Tabela 2** estão apresentados os valores das energias de ligação (eV) do C1s e O1s obtidos para o grafeno oxidado.

Tabela 2. Valores das energias de ligação XPS (eV) obtidos para o GO.

Amostra	C1s				O1s	
GO	284,6	285,6	287,2	291,1	533,2	535,3
	(1,6)	(2,0)	(1,9)	(2,0)	(2,6)	(2,6)
Frequência (%)	[45]	[46]	[6]	[3]	[90]	[10]

Os valores da energia de ligação de C1s em 284,6, 285,6, 287,2 e 291,1 eV estão relacionados com átomos de carbono ligados em estruturas poliaromáticas da grafite (284,6 eV), átomos de carbono com átomos de oxigênio não ligados (285,6-285,8 eV), carbono em grupos carbonila (287,2-287,5 eV) e carbono em grupos carbonato (290,5-291,2 eV) ^{88; 89}. Como consequência, os valores de energia de ligação de O1s em 533,2 e 535,3 eV indicam átomos de oxigênio da carbonila (ésteres), anidridos e átomos de oxigênio em grupos carboxila.

Na **Figura 9** está apresentada a imagem de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) dos QDs de CdTe suportados sobre GO. Observou-se que os QDs estão dispersos de forma homogênea com uma pequena distribuição no tamanho das partículas. Os diâmetros das partículas foram medidos diretamente a partir de imagens de TEM, utilizando um software Imagen Photo Pro Plus 6. Para estimar o tamanho e a distribuição das partículas sobre o grafeno oxidado, foi realizado um mapeamento de três diferentes superfícies de GO/CdTe, sintetizadas em dias diferentes. Para cada amostra, a imagem de TEM foi dividida em quatro partes iguais, sendo que cada parte foi mapeada e as partículas foram contadas. Desta forma foi possível construir um histograma.

Figura 9. Imagem de TEM para o sistema GO/CdTe. Detalhe: Histograma da distribuição do tamanho de partículas dos QDs.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2014⁸⁶.

O histograma apresentado no detalhe da **Figura 9** mostra uma maior quantidade de partículas de QDs com tamanho médio de 3,10 nm. O tamanho dos *quantum dots* de CdTe obtido foi muito próximo do valor estimado a partir do método teórico baseado no espectro UV-Vis e das medidas de DLS.

5.1.2 Estudo do comportamento eletroquímico do 17 β -estradiol utilizando o eletrodo de GC/GO/CdTe

O comportamento eletroquímico do 17 β -estradiol sobre a superfície do eletrodo de GC/GO/CdTe foi avaliado utilizando a voltametria cíclica (VC). Os experimentos de VC foram realizados em meio eletrolítico de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) na presença e na ausência de 17 β -estradiol 50 μ mol L⁻¹. O sistema foi investigado em um intervalo de potencial que variou de +0,2 a +1,0 V, com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Figura 10. Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de GC/GO/CdTe na presença de 17 β -estradiol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ curva (a) e ausência de 17 β -estradiol curva (b), com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Meio eletrolítico de PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 8,0). Detalhe: Mecanismo proposto para a oxidação eletroquímica do 17 β -estradiol.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2014⁸⁶.

Na **Figura 10**, foi observado que o 17 β -estradiol apresenta um único processo de oxidação em +0,55 V, sobre o eletrodo de GC modificado com o filme de GO/CdTe. Este processo de oxidação é atribuído à oxidação irreversível do grupo hidroxila presente no anel aromático da molécula do 17 β -estradiol formando espécie cetona como produto, conforme a proposta apresentada no detalhe da **Figura 10**.

Na **Figura 11** são exibidos os voltamogramas de DPV para a eletro-oxidação do 17 β -estradiol no escuro e na presença de luz. Os voltamogramas foram realizados utilizando o eletrodo de GC/GO/CdTe em PBS (pH 8,0) 0,1 mol L^{-1} contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 17 β -estradiol, tanto no escuro bem como na presença de uma fonte de luz visível, utilizando uma lâmpada de Hg (20 W de potência) acoplada diretamente no fundo da célula (**Figura 12**), com a finalidade de irradiar toda a área do eletrodo. As medidas eletroquímicas foram obtidas em uma faixa potencial variando de +0,2 a +0,8 V, com amplitude de pulso de 50 mV e passo de potencial de 1,0 mV. Constatou-se que o pico de corrente, atribuído à oxidação 17 β -estradiol,

aumentou quase 3 vezes na presença de luz, quando comparada com a mesma medida no escuro.

Figura 11. Voltamogramas de DPV para o eletrodo de GC/GO/CdTe na presença de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 17 β -estradiol em duas condições: (curva a) escuro e (curva b) presença de luz incidente. Detalhe: Resposta da fotocorrente do eletrodo de GC/GO/CdTe em um três ciclos liga/desliga para a luz incidente.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2014⁸⁶.

Figura 12. Célula fotoeletroquímica utilizada mostrando a lâmpada de Hg acoplada diretamente no fundo da célula.

Fonte: Autoria própria.

Para elucidar o aumento do pico de corrente na presença de luz incidente, um experimento amperométrico foi realizado a fim de investigar as propriedades fotoeletroquímicas dos quantum dots de CdTe. O detalhe da **Figura 11** mostra uma resposta típica de fotocorrente dependente do tempo de irradiação da luz, sendo que a medida foi repetida em três ciclos. Pode ser visto que o eletrodo de GC/GO/CdTe fornece uma rápida resposta à irradiação com luz, em um potencial aplicado em +0,8 V. A corrente aumenta imediatamente quando a luz é ligada e diminui reversivelmente quando a luz é desligada. O aumento na corrente de 12,1 mA é devido à indução dos QDs nas proximidade do *band gap*. Quando a luz é ligada, existe uma excitação dos QDs resultando na transferência dos elétrons da banda de valência para a banda de condução, obtendo-se assim os pares de elétrons/buraco. Quando a luz é desligada, há uma diminuição acentuada na corrente devido ao processo de recombinação dos pares elétrons/buracos. Este resultado confirmou que o sistema eletroquímico baseado em grafeno oxidado modificado com *quantum dots* de CdTe, na presença de luz, torna-se um interessante material para ser usado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para análise de contaminantes ambientais.

5.1.3 Otimizações dos parâmetros experimentais

Com a finalidade de maximizar o sinal analítico da técnica de DPV, foram avaliados os efeitos dos parâmetros experimentais, tais como: tipo de eletrólito, pH, potencial e tempo

de pré-tratamento, amplitude do pulso e potencial. Todas as medidas foram realizadas utilizando o eletrodo de GC/GO/CdTe, em meio contendo 17 β -estradiol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O efeito do eletrólito de suporte na resposta eletroquímica do 17 β -estradiol foi avaliado utilizando o eletrodo de GC/GO/CdTe. As medidas CV e DPV foram realizadas para os seguintes eletrólitos com concentração de 0,1 mol L⁻¹: KCl, KNO₃, Na₂SO₄, CH₃COONa e PBS. Todos os eletrólitos foram ajustados em pH 6,0, contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 17 β -estradiol. A voltametria cíclica foi realizada com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e a técnica de DPV foi realizada com amplitude de pulso de 50 mV e potencial de 1 mV.

Na **Figura 13** são observados os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de GC/GO/CdTe nos diferentes eletrólitos. Claramente pode ser observado que os eletrólitos compostos por PBS e acetato de sódio exibiram menor valor no potencial de oxidação do 17 β -estradiol, quando comparado aos outros eletrólitos estudados. Adicionalmente, pode ser visto que o perfil voltamétrico teve melhor definição para a solução de PBS e CH₃COONa, além de um significativo aumento na corrente de pico.

Figura 13. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos de GC/GO/CdTe em diferentes eletrólitos contendo 17 β -estradiol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria.

Nos voltamogramas da **Figura 13** pode ser visto que existe uma significativa diferença nos perfis voltamétricos das soluções de CH₃COONa e PBS. Entretanto, com a finalidade de

visualizar melhor esta diferença nos voltamogramas e escolher o melhor eletrólito para os experimentos subsequentes, medidas de DPV foram realizadas para estes dois eletrólitos. Os resultados apresentados na **Figura 14** mostram que o PBS exibiu um aumento de 2 vezes na corrente de picos de oxidação, com um pequeno deslocamento de potenciais para valores mais negativos. Desta forma a solução 0,1 mol L⁻¹ de PBS foi escolhido como o melhor eletrólito.

Figura 14. Voltamogramas de DPV em meio de solução 0,1 mol L⁻¹ de CH₃COONa e 0,1 mol L⁻¹ de PBS, cada um contendo 50 μmol L⁻¹ de 17β-estradiol.

Fonte: Autoria própria.

A dependência do processo de oxidação do 17β-estradiol com a variação do pH foi estudada por DPV em um intervalo de pH variando de 3,0 a 10,0. Os experimentos foram realizados em PBS 0,1 mol L⁻¹ contendo 17β-estradiol 50 μmol L⁻¹. A corrente de pico anódica aumentou com o aumento do pH até um valor máximo de 8,0 e decresceu para valores superiores. Com base nesta informação, pH 8,0 foi escolhido como pH ótimo para os estudos posteriores.

Foi observado que o processo de oxidação do hormônio acarreta em um envenenamento da superfície do eletrodo, seguido por uma redução do sinal analítico. Desta forma, foi estudado o efeito da aplicação de um potencial de pré-tratamento antes de cada varredura de DPV. O potencial foi investigado em um intervalo que variou de +0,2 a -1,0 V com incrementos de 100 mV de diferença para cada aplicação, apresentado na **Figura 15**.

Figura 15. Efeito do potencial de pré-tratamento no pico de corrente do processo de oxidação do hormônio em PBS 0,1 mol L⁻¹ contendo 17β-estradiol 50 μmol L⁻¹.

Fonte: Autoria própria.

A recuperação completa da resposta original foi obtida utilizando -0,90 V como potencial de pré-tratamento. Para potenciais mais positivos de limpeza, a corrente de pico, I_{pa} , obtida durante os voltamogramas de DPV diminuem atingindo apenas 30 % do valor original em +0,20 V. Desta forma, -0,90 V foi escolhido como o potencial pré-tratamento em estudos posteriores. O tempo de limpeza eletroquímica também foi avaliado em um intervalo estudado de 30 a 360 s, apresentado na **Figura 16**.

Figura 16. Efeito do tempo de pré-tratamento, utilizando as mesmas condições, com $E_{pré-tratamento} = -0,9$ V. Tempos estudados: 30, 40, 50, 60 120, 150, 180 e 360 s.

Fonte: Autoria própria.

O valor de I_{pa} cresceu até 180 s e nenhuma diferença foi observada para valores de tempo superiores. Portanto, 180 s foi escolhido como o tempo de pré-tratamento para limpar a superfície do eletrodo.

A influência dos parâmetros da técnica de também foi investigada. O efeito da amplitude foi estudado em um intervalo de 10 a 100 mV, com potencial fixado em 1 mV. O valor de I_{pa} aumentou até a amplitude de pulso de 50 mV. Para os valores de amplitude de pulso maior que 50 mV foram observados um alargamento seguido de deformação do perfil voltamétrico no pico de oxidação do 17β-estradiol. Desta forma, 50 mV foi escolhida como a amplitude ideal. Fixando a amplitude de pulso em 50 mV, o efeito do passo de potencial foi estudado em um intervalo variando de 1 a 10 mV. Para valores de potenciais superiores a 2 mV, foi observado uma deformação do perfil voltamétrico e a diminuição no valor de I_{pa} . Assim, os valores otimizados foram: amplitude de 50 mV e passo de potencial de 2 mV.

5.1.4 Características analíticas

As características analíticas foram estudadas, tendo como base as condições otimizadas utilizando DPV, para investigar a resposta eletroquímica como uma função da concentração de 17β-estradiol. No presente estudo, usando o eletrodo GC/GO/CdTe, respostas analíticas foram realizadas em duas condições diferentes, no escuro e na presença de uma de luz incidente, sendo que as respostas analíticas foram comparadas. Adições

sequenciais de soluções padrões de 17 β -estradiol foram usados para construir as curvas de calibração mostradas na **Figura 17**, sendo que as medidas foram feitas em triplicata.

Os sinais analíticos obtidos no escuro exibiram uma faixa linear entre 1,0 a 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9824$). O limite de detecção (LOD) foi calculado em 9,8 nmol L^{-1} (2,67 $\mu\text{g L}^{-1}$). A detecção foi bastante influenciada pela presença de uma fonte de luz incidente. O eletrodo de CG/GO/CdTe fotosensibilizado exibiu um aumento na faixa linear com valores de concentração variando de 0,2 a 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$), com valor de LOD de 2,8 nmol L^{-1} (0,76 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os valores foram determinados utilizando a relação $3\sigma/\text{coeficiente angular}$, onde σ é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas do branco, sendo estes valores coletadas no potencial de pico de oxidação do 17 β -estradiol. Os cálculos foram realizados de acordo com recomendações da IUPAC.

Figura 17. Dependência linear do pico de corrente de DPV e a concentração de 17 β -estradiol para o eletrodo de GC/GO/CdTe: no escuro (●) e na presença de luz (□). As concentrações de 17 β -estradiol em $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram: 0,20; 0,50; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00; 5,00; 10,00; 12,50; 15,00; 17,50 e 20,00.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2014⁸⁶.

Adicionalmente, o efeito da luz sobre a resposta do sensor proposto pode ser avaliada a partir dos valores de sensibilidade. Na presença de luz a sensibilidade do método (1,61 $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$) aumentou 2,6 vezes maior quando comparado com a sensibilidade no escuro

(0,62 $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$). Além disso, tanto os valores de LOD bem como os valores de sensibilidade foram comparados utilizando o teste *T-student*, ao nível de confiança de 95%, comparando o eletrodo de GC/GO/CdTe na presença e ausência de luz, comprovando assim a melhor eficiência do sistema na presença de luz.

Comparando os resultados obtidos para o eletrodo de GC/GO/CdTe na presença de luz incidente, com outros métodos eletroanalíticos na determinação de 17 β -estradiol, foi observado valores inferiores no limites de detecção, como no sensores baseados em nanotubos de carbono modificados com nanopartículas de platina (LOD = 16 nmol L⁻¹ (4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$)⁹⁰) e o eletrodo compósito à base de nanotubos de carbono modificados com Ni(Cyclam), cujo LOD foi de 63 nmol L⁻¹ (17,3 $\mu\text{g L}^{-1}$)⁹¹. O baixo limite de detecção e alta sensibilidade observados para o eletrodo de GC/GO/CdTe pode ser atribuído à melhoria na eficiência de transferência de carga, devido à excitação dos elétrons dos QDs na presença de luz incidente, o que promove a diminuição da energia de transferência eletrônica entre as bandas de valência e condução.

Alguns métodos eletroquímicos que utilizam biossensores para a detecção de 17 β -estradiol apresentaram limites de detecção mais baixos, como: 0,18 nmol L⁻¹ (50,0 ng L⁻¹)⁹² e 0,036 nmol L⁻¹ (9,9 ng L⁻¹)⁹³. No entanto, o eletrodo de GC/GO/CdTe apresentou importantes vantagens, tais como: alta sensibilidade, boa reprodutibilidade, simples instrumentação, fácil preparação e procedimentos analíticos rápidos. Este método pode ser facilmente aplicado na determinação de interferentes endócrinos em amostras reais.

5.1.5 Considerações gerais

Um novo nanomaterial foi utilizado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para determinação de interferentes endócrinos. Este material foi baseado em quantum dots de CdTe suportados sobre a superfície de grafeno oxidado. O nanohíbrido GO/CdTe foi caracterizado com sucesso utilizando as técnicas de TEM, DLS, espectrofotometria de UV-Vis e fluorescência, Raman e técnicas voltamétricas. Estas caracterizações mostraram claramente que partículas de CdTe possuíam um tamanho médio de 3,10 nm e encontraram-se suportadas sobre a superfície do GO. As propriedades eletrônicas do grafeno oxidado aliadas ao efeito fotoeletrocatalítico dos QDs mostraram grande eficiência na eletro-oxidação do hormônio 17 β -estradiol. Um problema no desenvolvimento do nanohíbrido é o tempo consumindo com a etapa de síntese. No entanto, esta desvantagem é minimizada pelo rendimento da síntese do nanohíbrido, o que permite a fabricação de mais de 500 eletrodos

em uma escala de síntese. Adicionalmente, o nanohíbrido podem ser armazenado durante 2 meses sem perder suas propriedades. Finalmente, o efeito sinérgico entre o grafeno oxidado e os *quantum dots* de CdTe forneceram valores para o LOD em níveis nanomolar, além de melhorar a reprodutibilidade e repetibilidade. Em essência, o eletrodo de GC/GO/CdTe apresenta-se como um material alternativo para o desenvolvimento de método de análise.

5.2 Biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de ródio suportadas em óxido de grafeno reduzido para a determinação de 17 β -estradiol

Um novo material nanocompósito constituído por óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de ródio (RGO-RhNP) foi sintetizado (previamente descrito na *Sessão 4.4*) por um processo de reação simultânea. A estratégia envolveu a redução simultânea da RuCl_3 e óxido de grafeno com NaBH_4 e a deposição *in situ* das nanopartículas metálicas nas folhas planas de grafeno. Eletrodos de carbono vítreo revestidos com este nanocompósito foram empregados como suporte nanoestruturado para a ligação cruzada da enzima lacase com glutaraldeído para construir um biossensor eletroquímico para a determinação de 17 β – estradiol.

O **Esquema 1** ilustra a estratégia utilizada para preparar o nanocompósito RGO-RhNP e o preparo do biossensor utilizando a enzima lacase para a determinação do hormônio 17 β - estradiol. Em primeiro lugar, o material nanocompósito foi preparado através de um esquema simultâneo, reduzindo íons Rh^{3+} com NaBH_4 na presença de óxido de grafeno e citrato de sódio. Através deste processo, nanopartículas Rh cobertas de citrato foram rapidamente se formado e, ao mesmo tempo, os resíduos de grupos epoxi e carbonilo, presentes sobre as folhas planas GO, foram transformados em grupos hidroxilo.

Esquema 1. Preparação do nanocompósito RGO-RhNP e do biossensor Lac/RGO-RhNP.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

Os grupos funcionais restantes de oxigênio (hidroxila e carboxila) poderiam atuar como ligantes para a fixação não covalente (mais provavelmente por interações doador-aceptor) das nanopartículas de Rh nas nanofolhas de GO, dando origem a um nanomaterial composto estável. O produto resultante foi facilmente disperso em água devido à presença de grupos ácido carboxílico das folhas de RGO, bem como o revestimento não-covalente de nanopartículas Rh com íons citrato.

A **Figura 18** mostra imagens dos resultados de microscopias TEM e HRTEM do nanocompósito RGO-RhNP. Observou-se nanopartículas esféricas altamente dispersas de $6,1 \pm 2,6$ nm, que abrange quase toda a superfície de grafeno. A análise TEM revela também que as nanopartículas metálicas foram localizadas apenas nos nanofolhas de RGO sugerindo a interação predominante com os grupos químicos na superfície de oxigênio deste nanomaterial 2D. A análise de HRTEM revelou uma característica altamente cristalina para as nanopartículas de Rh, com um espaçamento cristalino de 0,234 nm, o que pode ser atribuído para a fase Rh (111)⁹⁵.

Figura 18. Imagens das análises de microscopias TEM (A, B) e HRTEM (C) do nanocompósito RGO-RhNP. Análise EDS do nanomaterial (D).

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

Além disso, os planos cristalinos são facilmente visíveis nas bordas do nanocompósito devido à dobra ou enrolamento das folhas de RGO. O espaçamento inter-camadas entre planos vizinhos foi determinada como 0,613 nm, a qual é maior do que o espaçamento interplanar em grafite (0,340 nm), o que pode ser atribuído às nanopartículas metálicas volumosas no plano basal das folhas de óxido de grafeno reduzidas. A presença de nanopartículas de Rh foi confirmada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) como ilustrado na **Figura 18 (D)**.

A **Figura 19** mostra a caracterização dos derivados de grafeno por espectroscopia de infravermelho (FT-IR). GO exibiu um pico largo a 3405 cm^{-1} correspondente ao alongamento (*stretching*) dos grupos OH ligados intermolecularmente, bem como picos a 1383 cm^{-1} e 1228 cm^{-1} , correspondente ao alongamento dos grupos C-O-C e C-OH e em domínios de grafite não oxidados, respectivamente. Os picos a 1724 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$) e 1062 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$), também confirma a presença de grupos funcionais de oxigênio neste nanomaterial⁹⁶.

Figura 19. Espectroscopias de FT-IR (A), e Raman (B), análise de GO (a) e RGO-RhNP (b). Análise de AFM (C) e perfil topográfico de AFM do nanocompósito RGO-RhNP.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

A análise de FT-IR não foi capaz de confirmar a decoração de GO com nanopartículas de Rh. No entanto, a redução parcial com NaBH_4 foi avaliada pela redução notável da intensidade dos picos a 1724 cm^{-1} e 1228 cm^{-1} sugerindo muito baixo teor de grupos carbonila e de epóxi no nanomaterial compósito.

A **Figura 19** (B) mostra a caracterização dos derivados de grafeno por espectroscopia Raman. A análise de GO apresentou as bandas características G e D a 1598 cm^{-1} e 1347 cm^{-1} atribuídas à fase de vibração da rede de grafite e os distúrbios estruturais nas bordas de grafite, respectivamente. A banda G foi ligeiramente deslocada para 1599 cm^{-1} após a redução com NaBH_4 e o ancoramento das nanopartículas de Rh. No entanto, a razão das intensidades D/G para GO apresentou um aumento de 0,96 para 1,05 após esta transformação (redução), o que sugere a interação entre as nanopartículas metálicas e as folhas de grafeno, tal como anteriormente descrito para os derivados de outras nanopartículas e grafeno^{97; 98}.

A análise topológica do nanocompósito foi realizada por AFM em modo *tapping*, e os resultados estão apresentados na **Figura 19** (C, D). As folhas de GO não decoradas apresentaram morfologia plana com uma espessura de 1,3 nm, de acordo com o relatado para este nanomaterial 2D^{96; 99}. A presença de nanopartículas metálicas foi claramente identificada por AFM mostrando estruturas coloidais com uma variedade de tamanhos que variaram de 1,0 nm a 8,2 nm. Além disso, também foram observados agregados volumosos nanométricos.

Resultados semelhantes foram obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figura 20**). A topologia característica das folhas esfoliadas de GO foram transformadas em um material nanocompósito mais complexo, em que os agregados coloidais são detectados, por decoração com as nanopartículas metálicas de ródio.

Figura 20. Imagens MEV de GO (A), RGO-RhNP (B) e Lac/RGO-RhNP/GCE (C).

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

5.2.1 Montagem e caracterização do eletrodo enzimático

O material nanocompósito foi avaliado como plataforma para a confecção de um biossensor enzimático eletroquímico para a determinação de 17 β -estradiol. Como está ilustrado no **Esquema 1**, o biossensor foi montado por revestimento (*casting*) de eletrodos de carbono vítreo (filmes finos) com o nanocompósito RGO-RhNP e ainda a imobilização da enzima lacase, utilizando glutaraldeído como agente de reticulação. É bem conhecido que o glutaraldeído pode formar adutos de reticulação estáveis por reação com vários nucleófilos tais como amina, tiol, hidroxilo e grupos imidazol¹⁰⁰, e estas propriedades têm sido muito utilizada para preparar biocatalisadores imobilizados, filmes poliméricos, micropartículas, hidrogéis e membranas^{101; 102; 103}. O **Esquema 2** mostra as ligações que podem ser formadas sobre a interface de detecção por reticulação dos grupos hidroxilo no nanocompósito RGO-RhNP com os grupos amino primários na superfície da lacase.

Esquema 2. Visualização esquemática da reação envolvida na imobilização de lacase na superfície do eletrodo por meio de ligação cruzada do grupo amino primário da enzima e dos grupos hidroxilos do nanocompósito RGO-RhNP com glutaraldeído.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

No entanto, a reticulação com glutaraldeído, pode proporcionar os derivados de enzimas com baixa atividade catalítica devido à transformação de resíduos de aminoácidos essenciais localizadas no local ativo da enzima ou por "congelar" a estrutura 3D da enzima¹⁰⁴. Por esta razão, o poli (etilenoglicol) éter diglicidílico (PEGDGE) também foi avaliado como um potencial agente de ligação cruzada para a montagem do eletrodo de enzimático. Como pode ser observado na **Figura 21**, notavelmente maiores picos voltamétricos foram alcançados usando glutaraldeído para imobilizar a enzima na superfície do eletrodo. Por conseguinte, este agente de reticulação foi empregado nos outros experimentos.

Figura 21. Resposta voltamétrica para os eletrodos de Lac/RGO-RhNP/GCE, preparado usando 3 μmol de glutaraldeído (a) ou poli (etilenoglicol) éter diglicidílico (b), como agentes de reticulação, em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo 1 mM de tionina antes (0) e após (1) adição de 17β -estradiol a 50 nmol L^{-1} de concentração final. Velocidade de varredura: 25 mVs^{-1} .

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

Além disso, GCE foi selecionado para montar o biossensor enzimático devido à alta pureza, a estabilidade mecânica e a janela eletroquímica deste material, assim como a elevada reprodutibilidade normalmente observada para dispositivos eletroanalíticos através desta interface de carbono¹⁰⁵.

O eletrodo enzimático foi posteriormente utilizado para determinar 17 β -estradiol por métodos amperométricos usando tionina como mediador eletroquímico. Em paralelo, um polímero de ósmio (OsP) baseado em poli(4-vinilpiridina) tendo porções de $\text{Os}(2,2'\text{-bipiridina})_2\text{Cl}]^{2+}$ também foi sintetizado¹⁰⁶ e avaliado como mediador eletroquímico. Para construir este novo eletrodo modificado, 20 μL de solução etanólica de 0,3 mol L^{-1} de OsP foi depositado na superfície de RGO-RhNP/GCE, secas à temperatura ambiente e usado como suporte para a imobilização da enzima lacase (Lac/OsP/RGO-RhNP/GCE). Embora esta plataforma permita evitar o uso de tionina como mediador eletroquímico em solução, a resposta obtida através de voltametrias cíclicas para o eletrodo modificado com Lac/OsP/RGO-RhNP/GCE na determinação de 17 β -estradiol foi significativamente menor do que a registrada utilizando o eletrodo modificado com Lac/RGO-RhNP/GCE. Além disso, o pico de oxidação foi observado em valor de potencial visivelmente mais positivo (**Figura 22**). Assim, a estratégia que envolve a utilização de tionina como mediador eletroquímico foi escolhida para os estudos posteriores.

Figura 22. Voltamogramas cíclicos em resposta ao eletrodo modificado com Lac/RGO-RhNP/GCE (A) em tampão de fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 contendo 1 mM de tionina, e Lac/OsP/RGO-RhNP/GCE (B) em tampão de fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, na ausência (a) e na presença (b) de 0,5 µM de 17β-estradiol. Velocidade de varredura: 50 mVs⁻¹.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

O eletrodo contendo o filme de RGO-RhNP foi caracterizado por voltametria cíclica em solução 0,5 mol L⁻¹ de HCl para validar a presença do ródio na nanomaterial (**Figura 23** (A)). Em comparação com o GO/GCE, a corrente de fundo (corrente capacitiva) do RGO-RhNP/GCE aumentou implicando extremamente uma maior área de superfície eletroativa do filme de nanocompósito na superfície do eletrodo. Dois picos de oxidação bem definidos em +410 mV e +704 mV foram também observados, o que pode ser atribuído à transformação redox da superfície RhNP em meio ácido para adutos Rh (I) e Rh (III), respectivamente. Além disso, o pico catódico observado ao potencial +240 mV pode estar associado a uma maior redução das espécies de Rh (0).

Figura 23. A) Voltametria cíclica de GO/GCE (a) e RGO-RhNP/GCE (b) em HCl 0,5 M, $v = 25 \text{ mVs}^{-1}$. B) Espectros de impedância eletroquímica referentes a resposta do GCE antes (a) e após o revestimento com o filme de RGO-RhNP (b) e Lac/RGO-RhNP em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1: 1).

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

5.2.2 Otimizações e aplicações do biossensor enzimático

As condições experimentais para a montagem do eletrodo enzimático Lac/RGO-RhNP/GCE foram otimizadas avaliando a influência de diferentes parâmetros na resposta voltamétrica de pulso diferencial (DPV) biossensor em relação a determinação de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17 β -estradiol em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 contendo 1 mmol L^{-1} de tionina como mediador eletroquímico. Estas medidas foram realizadas usando as seguintes condições DPV: amplitude de pulso = 75 mV, e passo de potencial = 1 mV. Conforme pode ser observado na **Figura 24**, respostas analíticas maiores foram obtidas utilizando eletrodos recobertos com 5 mg de nanocompósito para a imobilização de 66 mg de lacase usando 3% (v/v) de glutaraldeído como agente de reticulação.

Figura 24. Influência da quantidade de RGO-RhNP (A) lacase (B) e glutaraldeído (C) em relação ao sinal de DPV para o eletrodo enzimático em determinação de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol em tampão de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 contendo 1 mmol L^{-1} de tionina. Amplitude de pulso = 75 mV , passo de potencial = 1 mV .

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

A montagem do eletrodo, sob tais condições ótimas, foi estudada por espectroscopia de impedância electroquímica (EIE) utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como sonda redox (**Figura 23 (B)**). Os dados experimentais foram obtidos por ajustes (*fitting*) de um circuito equivalente de Randles convencional. A modificação do GCE com o nanocompósito aumentou ligeiramente a resistência de transferência de elétrons da interface de $R_{\text{et}} = 113 \, \Omega$ para $R_{\text{et}} = 132 \, \Omega$. Um grande aumento relativo no valor R_{et} , $538 \, \Omega$, foi observado após reticulação da lacase com glutaraldeído, indicando a imobilização bem-sucedida da enzima na superfície do nanocompósito. Este fato foi também confirmado por MEV (**Figura 20 (C)**), mostrando que o eletrodo modificado com a enzima exibiu uma morfologia lisa e homogênea que pode ser atribuída a uma carga elevada de proteína na superfície do eletrodo.

O comportamento eletroanalítico do eletrodo enzimático nanoestruturado na determinação do hormônio 17β -estradiol foi estudado por voltametria cíclica e DPV usando tionina como mediador eletroquímico. Como experimentos de controle, voltamogramas com GCE modificados com outras combinações de componentes da interface do biossensor também foram estudadas. Conforme pode ser observado na **Figura 25**, todos os eletrodos mostraram respostas de voltametria, que podem ser atribuídas à transformação eletroquímica da tionina na superfície do eletrodo. A presença de RhNP na interface do sensor causou um efeito eletrocatalítico na determinação analítica de 17β -estradiol, reduzindo o potencial eletroquímico ao qual os picos de voltametria podem ser medidos. Além disso, um novo pico em torno de $0,0 \, \text{V}$ foi claramente observado nos voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos modificados com RGO-RhNP/GCE e Lac/RGO-RhNP/GCE, o que deve ser atribuído à presença de RhNP na nanomaterial compósito (**Figura 25(B)**, curvas d-e; **Figura 26**).

Figura 25. Voltamogramas cíclicos (A) e pulso diferencial (B), em resposta ao eletrodo GCE (a), GO/GCE (b), Lac/GO/GCE (c), RGO-RhNP/GCE (d) e Lac/RGO-RhNP/GCE (e) na determinação de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol em condições otimizadas.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

Figura 26. Resposta de DPV em relação ao eletrodo enzimático na determinação de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol em condições otimizadas, na ausência (a) e na presença (b) de 1 mmol L^{-1} de tionina.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

O eletrodo modificado com o filme de RGO-RhNP apresentou uma resposta para 17β -estradiol semelhante à obtida para o eletrodo enzimático preparada usando lacase inativada termicamente, como controle para fins de comparações. No entanto, grandes sinais eletroquímicos foram obtidos através da combinação de lacase ativa e o material

nanocompósito RGO-RhNP na superfície do sensor, o que demonstra que a enzima é necessária para uma transformação eletrocatalítica eficiente de 17 β -estradiol, e em conformidade, a arquitetura de interface proposta apresentou uma boa alternativa para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para este hormônio.

Para assegurar que o sinal analítico observado em relação ao eletrodo enzimático está relacionado com a transformação mediada pela lacase de 17 β -estradiol na presença de tionina em solução, um estudo controle foi executado por meio da realização de voltamogramas cíclicos no eletrodo de Lac/RGO-RhNP/GCE antes e depois da adição de hormônio. Como pode se observar na **Figura 27**, nenhuma resposta significativa foi observada em soluções de tionina com concentração de 1 mmol L⁻¹ em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. No entanto, picos redox bem definidos, com altura de pico crescentes com a concentração hormonal foram observados após a adição de 17 β -estradiol.

Figura 27. Voltamogramas cíclicos em relação ao eletrodo Lac/RGO-RhNP/GCE em condições otimizadas, com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹ (A) e 25 mV s⁻¹ (B) na ausência (a) e na presença de 5 nM (b), 10 nM (c), 15 nM (d), 20 nM (e), 30 nM (f), 40 nM (g) e 50 nM (h) de 17 β -estradiol.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

Estes estudos de voltametria cíclica foram realizados a baixas taxas de velocidade de varredura para que o efeito da concentração de 17 β -estradiol se tornasse mais visíveis nos picos resultantes.

Foi também demonstrado que a determinação de 17 β -estradiol pode ser realizada a um valor de potencial muito baixo quando a tionina foi utilizada como mediador eletroquímico, observado anteriormente na **Figura 26**.

O **Esquema 3** ilustra o mecanismo eletrocatalítico proposto envolvido na transformação de 17 β -estradiol mediada pela enzima na superfície do eletrodo por meio da tionina como mediador eletroquímico.

Esquema 3. Visualização esquemática do mecanismo eletrocatalítico proposto para o biossensor enzimático.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H., *et al.*, 2016⁹⁴.

Tendo em conta que as melhores respostas eletroanalíticas obtidas foram utilizando DPV, os estudos posteriores no biossensoriamento foram realizados usando este método eletroquímico. Os estudos de otimização de DPV para o biossensoriamento eletroquímico de 17 β -estradiol estão apresentados na **Figura 28**.

Figura 28. Influência do pH (A), concentração de tionina (B), amplitude de pulso (C) e o passo de potencial (D) sobre o sinal analítico de DPV para o eletrodo enzimático na determinação de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol em tampão de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

De forma interessante, os sinais analíticos mais elevados foram registrados usando tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 (**Figura 28 (A)**). Deve ser lembrar que o pH ótimo para a atividade catalítica de lacase *T. versicolor* (não imobilizada) geralmente ocorre na região ácida, tipicamente na faixa de 3,5 a 6,0, dependendo do substrato¹⁰⁷. Por conseguinte, a atividade enzimática em relação ao pH, comportamento observado na **Figura 28 (A)** pode ser causada por:

- i) Um aumento no comportamento eletrocatalítico da enzima a pH neutro mediante a imobilização, e/ou
- ii) Uma transformação eletroquímica rápida de alguns reagentes/produtos da reação catalisada pela enzima ocorrendo sob condições neutras.

Para elucidar esta questão, o efeito do pH sobre o sinal analítico do eletrodo RGO-RhNP/GCE em resposta a determinação de 17β -estradiol foi avaliada por DPV, também por adição de lacase à mistura de reação. Conforme pode ser observado na **Figura 29**, um sinal eletroanalítico mais intenso foi registrado utilizando a enzima livre em pH 6,0. Este fato sugere que a imobilização da enzima sobre a superfície da nanoestruturada em eletrodo de Lac/RGO-RhNP/GCE provoca alterações relevantes no microambiente da enzima imobilizada, em seguida, mudando o pH ótimo para valores neutros. Comportamento semelhante foi previamente relatado para outras enzimas sobre a imobilização ou modificação covalente com compostos macromoleculares e poliméricos^{108; 109}.

Figura 29. Análises de DPV em relação ao eletrodo rGO-RhNP/GCE na determinação de $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 17β -estradiol em tampão de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0 (a), pH 6,0 (b) e pH 7,0 (c) na presença de $70 \text{ }\mu\text{g}$ de enzima lacase livre.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

Também foi demonstrado que as correntes de pico maiores foram medidas com concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tionina (**Figura 28 (B)**), bem como para uma amplitude de pulso na DPV de 75 mV e um passo de potencial de 1 mV (**Figura 28 (C, D)**). Com esses resultados, estas condições de trabalho foram selecionadas para os outros estudos.

A **Figura 30** mostra os voltamogramas de pulso diferencial registrados utilizando o eletrodo enzimático nanoestruturado mediante adições sucessivas de 17β -estradiol. Os valores de corrente de pico aumentaram com a concentração de hormônio exibindo um

comportamento linear ($r = 0,997$) durante o intervalo de concentração de 0,9 a 11,0 pmol L⁻¹, de acordo com a seguinte equação:

$$i \text{ (A)} = (1,8 \pm 0,3) \times 10^{-6} \times c(17\beta\text{-estradiol/mol L}^{-1}) + (1,42 \pm 0,03) \times 10^{-5}$$

Esta faixa de resposta linear foi menor do que outros estudos previamente relatados para biossensores eletroquímicos para 17 β -estradiol baseado em afinidade de bioreceptores (**Tabela 3**). No entanto, o biossensor desenvolvido garante a determinação precisa do hormônio ao nível de concentração picomolar.

Figura 30. A) DP voltamogramas registrados no eletrodo enzimático nanoestruturado para 0 (a), 0,9 pM (b), 1,8 pM (c), 2,7 pM (d), 3,6 pM (e), 5,4 pM (f), 7,2 pM (g), 8,9 pM (h) e 11,0 pM (i) de 17 β -estradiol. B) Curva analítica construída para 17 β -estradiol realizada no biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

O biossensor enzimático apresentou uma alta sensibilidade de 1,8 A/μM (25,7 A/μM cm²), o qual foi estimado usando a área de superfície eletroativa do nanocompósito Lac/RGO-RhNP/GCE calculada através da equação Randles-Sevcik. Esta alta sensibilidade pode ser atribuída à grande área de superfície eletroativa do eletrodo modificado, o efeito eletrocatalítico sinérgico de RhNPs e lacase para a oxidação de 17 β -estradiol, e a ocorrência da rápida transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo. Isso devido à alta eletrocondutividade e baixa barreira condutora, propriedades da arquitetura 3D do nanomaterial híbrido desenvolvido.

Um limite de detecção muito baixo de 0,54 pmol L⁻¹ de concentração na determinação de 17 β -estradiol foi calculado para este biossensor. Este valor foi calculado de acordo com o critério $3S_b/m$, em que m é a inclinação da curva de calibração e S_b foi estimado como o

desvio padrão de 10 sinais diferentes DPV registados para a menor concentração de 17 β -estradiol medido na curva de calibração (0,9 pmol L⁻¹). Como pode ser observado na **Tabela 3**, este baixo valor de limite de detecção está entre os melhores obtidos para a detecção eletroquímica do hormônio. No entanto o dispositivo desenvolvido à base de enzimas é caracterizado por um *design* simples, de baixo custo e de fácil operação, em contraste com esses biossensores baseados em afinidades descritos anteriormente.

Tabela 3. Comparação do desempenho analítico de biossensores eletroquímicos relevantes para 17 β -estradiol.

Eletrodo	Bioreceptor / Método	Faixa Linear (pmol L ⁻¹)	LOD (pmol L ⁻¹)	Referências
Apt-Au	Aptâmero/EIS	10-10 ⁴	2	¹¹⁰
ER α /BSA/Au	ER α /EIS	0,1-10 ³	0,1	¹¹¹
Apt/AuNP/CuS/GCE	Aptâmero/DPV	0,-10 ³	0,7	¹¹²
Apt/AuD/BDDE	Aptâmero/EIS	10 ⁻² -10 ³	0,005	¹¹³
E2/PAMAM-AuNP/RGO-PANI/GCE	Anticorpo (competitivo)/DPV	0,15-26	0,07	¹¹⁴
Apt/WS ₂ /AuNP/GCE	Aptâmero/DPV	10-5x10 ³	2	¹¹⁵
Lac/RGO-RhNP/GCE	Enzima/DPV	0,9-11	0,54	Este trabalho

LOD: Limite de detecção; Apt: aptâmero; ER α : receptor α de estrogênio; AuNP: nanopartículas de ouro; CuS: sulfeto de cobre; AuD: microestruturas dendríticas de ouro; E2: 17 β -estradiol; PAMAM: dendrímero de etilenodiamina de poliamidoamina; PANI: polianilina; WS₂: sulfeto de tungstênio.

Estas excelentes propriedades analíticas podem estar associadas com a utilização de RGO-RhNP como plataforma nanoestruturada para a imobilização covalente da enzima. Para apoiar esta hipótese, as constantes cinéticas aparentes para a enzima imobilizada foram calculadas pelo método proposto por Lineweaver-Burk. Os valores obtidos foram de 9,9 pM e 68 μ A para K_M e I_{MAX} , respectivamente. Este valor muito baixo da constante aparente K_M sugere que o RGO-RhNP fornece um microambiente favorável para a transformação mediada pela lacase de 17 β -estradiol na superfície do eletrodo.

A reprodutibilidade do biossensor para adições sucessivas de 17 β -estradiol foi examinada no intervalo 1,8 – 5,4 pmol L⁻¹. O R.S.D. para os valores de inclinação medidos com 10 análises de calibração diferentes foi de 3,4%. Além disso, a reprodutibilidade de biossensor para biossensor foi avaliada através da medição dos valores da inclinação obtidas dos gráficos de curvas de calibração construídas com 5 diferentes biossensores preparados da mesma maneira. O valor de R.S.D. foi de 8,2%, indicando uma boa reprodutibilidade para o procedimento empregado na montagem do biossensor enzimático.

Deve se notar que este biossensor foi também avaliado para a detecção amperométrica de 17 β -estradiol em modo contínuo utilizando disposição de injeção de fluxo. Foi obtida uma resposta analítica mais elevada definindo o potencial aplicado durante a análise em -220 mV. O biossensor foi capaz de detectar o hormônio no intervalo de concentração de 3,6 – 270 μ mol L⁻¹ de acordo com a seguinte equação (**Figura 31 (A)**):

$$i \text{ (A)} = (104 \pm 60) \times c(17\beta\text{-estradiol/mol L}^{-1}) + (6,2 \pm 0,8) \times 10^{-4}$$

No entanto, a resposta amperométrica demonstrou uma diminuição progressiva na corrente de pico como pode ser observado na **Figura 31 (B)**, sugerindo assim uma estabilidade mais fraca do biossensor sob condições de fluxo contínuo.

Figura 31. Curva de calibração construídas para 17 β -estradiol utilizando biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE (A) e sinais analíticos obtidos para 3,6 μ M de 17 β -estradiol em análises de injeção de fluxo (B).

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

A seletividade do biossensor foi avaliada por medições das respostas de DPV a partir de 8 substâncias diferentes como potenciais interferentes na concentração de 50 pmol L^{-1} , e comparando com os valores obtidos na determinação de 5 pmol L^{-1} de 17β -estradiol sob as mesmas condições de análises. Sinais analíticos muito baixos foram registrados para o ácido ascórbico (0,7%), hidroquinona (1,0%), dopamina (1,2%), o bisfenol A (1,6%), catecol (1,9%), a progesterona (2,1%), estriol (2,2%) e etinilestradiol (2,7%), sugerindo uma seletividade elevada do biossensor enzimático nanoestruturado na determinação de 17β -estradiol.

A estabilidade em longo prazo do biossensor foi estimada através do armazenamento do eletrodo enzimático a 4°C sob condições secas. O eletrodo foi periodicamente posto a prova sendo realizadas medidas da resposta analítica em todo o intervalo linear da resposta estudada para o 17β -estradiol, e os valores das inclinações das curvas de calibração resultantes foram comparados com os obtidos no primeiro dia de utilização (**Figura 32**).

Figura 32. Efeito do tempo de armazenamento a 4°C na inclinação da curva de calibração do biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE.

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016⁹⁴.

O biossensor reteve mais do que 96% da atividade eletroanalítica inicial após uma semana de armazenamento, em tempos mais longos, armazenado a 4°C , produziu uma perda

progressiva de resposta analítica atingindo cerca de 83% e 54% da atividade inicial após duas e quatro semanas de armazenagem, respectivamente.

O biossensor enzimático nanoestruturado foi utilizado para determinar o teor de 17β -estradiol presente em amostras de urina real e sintética (*Urine Chemistry Control, BIO-RAD, USA*). Para isso, amostras de urina foram fortificadas com 17β -estradiol, devidamente diluídas e analisadas com o biossensor nanoestruturado (**Figura 33**). Já que a urina humana é considerada uma das maiores fontes de compostos considerados desreguladores endócrinos liberada para o meio ambiente ¹¹⁶. Por outro lado, a determinação dos principais estrogênios biologicamente ativos, tais como 17β -estradiol, em amostras de urina é relevante para avaliar a ação e mau funcionamento das glândulas endócrinas, e, conseqüentemente, para detectar potenciais distúrbios endócrinos que estão normalmente associados com muitas doenças como o câncer da mama, anorexia nervosa, e pseudo-hermafroditismo ¹¹⁷.

Figura 33. Curva analítica construída a partir da análise de 17β -estradiol utilizando o biossensor Lac/RGO-RhNP/GCE para urina sintética fortificada (A) e amostra real de urina (B).

Fonte: Povedano, E., Cincotto, F. H. *et al.*, 2016 ⁹⁴.

Valores elevados de recuperação de $99,6 \pm 0,8\%$ e $98,9 \pm 0,6\%$ foram obtidos para amostras de urina reais e sintéticas, demonstrando a confiabilidade analítica do dispositivo eletroquímico propostos para quantificar 17β -estradiol em amostras reais.

5.2.3 Considerações gerais

Um novo material nanocompósito foi preparado *in situ* pela redução e decoração de óxido de grafeno com nanopartículas de ródio. Este nanomaterial foi utilizado para modificar o GCE e, em seguida, utilizado como plataforma para imobilizar a enzima lacase na superfície do eletrodo por meio de uma reação de ligação cruzada com glutaraldeído. Este eletrodo enzimático foi utilizado no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a determinação de 17β -estradiol, que exibiu elevada sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, sendo capaz de detectar o hormônio em níveis de concentração picomolar. Este biossensor eletroquímico foi utilizado com sucesso para detectar 17β -estradiol em amostras reais e sintéticas de urina com altos valores de recuperação. Com estes resultados obtidos, sugerimos o uso deste nanomaterial 2D como uma excelente ferramenta para preparar biossensores enzimáticos à base de oxidase sensíveis e confiáveis para os compostos de desregulação endócrina.

5.3 Combinação sinérgica de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de antimônio para a determinação do hormônio estriol

Neste estudo uma nova modificação em eletrodo de carbono vítreo foi desenvolvida com base na combinação sinérgica de nanopartículas de antimônio (SbNPs) e óxido de grafeno reduzido (rGO), que pode ser utilizado para a determinação de estriol em amostras ambientais. O material compósito rGO-SbNPs (previamente sintetizado como descrito na *sessão 4.5*) foi caracterizado por microscopia FEG-SEM e eletroquimicamente, que indicou que a GO foi reduzido e que o rGO foi modificado com as nanopartículas antimônio.

Uma gota de suspensão etanólica deste material foi aplicada sobre o substrato de Si e as micrografias FEG-SEM de GO, rGO e rGO-SbNPs estão apresentadas na **Figura 34**. A **Figura 34 (A)** apresenta imagens típicas de GO, onde é evidente que o material consiste em uma mistura de camadas de folhas individuais e multicamadas de grafeno. GO, como materiais bidimensionais, tendem a se sobrepor por meio de interações π - π , o que faz com que ocorra o bloqueio de sítios cataliticamente ativos¹¹⁸. Por outro lado, a **Figura 34 (B)** apresenta as imagens de rGO, em que o material exibiu uma estrutura enrugada típica com abundância de ondulações. A redução do óxido de grafeno reduz a interação entre as folhas de GO, e conseqüentemente, o não bloqueio de sítios ativos. A inserção em destaque na **Figura 34 (A)** apresenta espectros Raman para as folhas de GO. Foi possível observar que o GO sintetizado apresentou duas bandas de absorção características no seu espectro Raman: a banda G, em 1590 cm^{-1} e a banda D em 1355 cm^{-1} . A relação entre a intensidade da banda D (I_D) e banda G (I_G) obtida para a relação I_D/I_G foi de 0,94 para as folhas de GO obtidas. Já, o destaque na **Figura 34 (B)** apresenta os espectros de Raman típico para as folhas de rGO. A maior amplitude da banda D sugere o aumento da desordem e confirma a ocorrência de óxido de grafeno reduzido. A relação I_D/I_G obtida foi de 1,05 para as folhas de rGO.

Figura 34. Micrografias FEG-SEM para os composto (A) GO, (B) rGO e (C) rGO-SbNPs. Destaque (A) e (B) apresentam espectros Raman para as folhas de GO e rGO, respectivamente.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015 ¹¹⁹.

Na **Figura 34** (C) está representada a imagem do compósito rGO-SbNPs, na qual é possível observar que o rGO é modificado com um grande número de nanopartículas de Sb. Além disso, a folha de rGO está em sua forma enrolada apresentando as nanopartículas de antimônio com tamanhos que variaram entre 5 e 40 nm.

A presença de nanopartículas de Sb sobre o composto também foi caracterizada eletroquimicamente. Análises de voltametrias cíclicas foram realizadas em HCl 0,5 mol L⁻¹ com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. O comportamento eletroquímico do eletrodo GC modificado com o compósito rGO-SbNPs foi comparado com a resposta voltamétrica dos eletrodos de GC/GO e GC/rGO. Nenhum processo eletroquímico foi observado (**Figura 35**) para a resposta voltamétrica usando os eletrodos GC/GO (curva a) e GC/rGO (curva b). No entanto, o eletrodo GC modificado com o compósito rGO-SbNPs apresentou um pico ao potencial de -34 mV, o que corresponde à oxidação de Sb⁰ para Sb³⁺. Como a concentração das espécies superficiais de antimônio aumenta, uma camada de Sb₂O₃ pode formar, levando a passivação da superfície. Na varredura reversa, um pico bem definido em potencial de -284 mV foi atribuído à redução do óxido de Sb.

Figura 35. Voltametria cíclica em 0,5 mol L⁻¹ de HCl, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ para os eletrodos: (a) GC/GO, (b) GC/rGO e (c) GC/rGO-SbNPs.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015¹¹⁹.

Esta resposta eletroquímica concorda com os resultados relatados anteriormente na literatura em que os nanotubos de carbono e SbNPs foram utilizados^{120; 121}, o que demonstra que as nanopartículas de Sb foram suportadas nas folhas de rGO. Quando os nanotubos de carbono foram utilizados na preparação do compósito, o potencial de oxidação de Sb foi observado em -30 mV e o potencial de redução ocorreu a -320 mV¹²⁰. O efeito eletrocatalítico do rGO em relação aos nanotubos de carbono é demonstrada, uma vez que foram observados um aumento na reversibilidade dos processos de oxidação e redução do Sb. Além disso, o sinal eletroquímico é mais definido quando o rGO foi utilizado nos eletrodos.

5.3.1 Comportamento eletroquímico do eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs em relação ao processo de oxidação de estriol.

O comportamento eletroquímico do estriol em relação a resposta do eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs foi estudado por voltametria cíclica em 0,1 mol L⁻¹ de PBS, pH 7,0, contendo 50,0 µmol L⁻¹ de estriol, com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Os resultados estão apresentados na **Figura 36**. Nenhum processo eletroquímico foi observado para a resposta voltamétrica na ausência de estriol (linha pontilhada). No entanto, na presença de estriol (linha cheia), se observa o pico de oxidação bem definido, processo irreversível, em +0,54 V *vs* Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹), o que corresponde à oxidação do grupo hidroxilo fenólico na estrutura do estriol como o mecanismo mostrado na inserção da **Figura 36**.

Figura 36. Voltametria cíclica em resposta ao eletrodo composto GC/rGO-SbNPs em 0,1 mol L⁻¹ PBS pH 7,0, na ausência (linha pontilhada) e na presença (linha cheia) de 50,0 µmol L⁻¹ de estriol com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Detalhe: mecanismo eletroquímico proposto para a oxidação estriol.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015 ¹¹⁹.

Para confirmar o mecanismo de oxidação do estriol em resposta ao eletrodo composto GC/rGO-SbNPs, a dependência em relação a oxidação eletroquímica do estriol *vs.* pH foi estudada por varreduras de pulso diferencial (DPV) a pHs que variaram de 4,0 e 10,0, em PBS contendo 50,0 µmol L⁻¹ de estriol. Os resultados estão apresentados na **Figura 37**, gráfico da corrente de pico obtida da DPV (I_{pa}) e potencial de pico (E_{pa}) em função do pH. A variação do E_{pa} com o valor de pH fornece informações valiosas sobre o processo de oxidação estriol. A redução da concentração iônica de hidrogênio do eletrólito provoca uma mudança no potencial de pico na oxidação de estriol para valores mais negativos, como pode ser observado na **Figura 37**. Esta é uma consequência da desprotonação durante o processo de oxidação, o que é facilitado pelo maior valor de pH. Os valores de E_{pa} *vs.* pH mostraram uma relação linear, com uma inclinação de 62 mV por unidade de pH. Portanto, o processo eletroquímico envolve o mesmo número de prótons e elétrons durante a eletro-oxidação de estriol, que é um comportamento típico para a oxidação de fenóis. Assim, se propõe que o

processo de oxidação do estriol envolve um elétron e um próton, de acordo com outros estudos relatados^{70; 122}.

Figura 37. Efeito do pH sobre o potencial de pico (■) e de corrente de pico (●) para a oxidação de estriol em resposta ao eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs em PBS 0,1 mol L⁻¹ contendo estriol 50,0 μmol L⁻¹.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015¹¹⁹.

Com relação à I_{pa} vs. pH na presença do estriol, se observa que a corrente de pico anódica aumenta na faixa de pH de 4,0 a 9,0, atingindo um valor máximo no pH 9,0, e uma ligeira diminuição no pH 10. Este valor era esperado porque o pKa do estriol é de 10,4 para o grupo hidroxilo¹²³. Portanto, pH 9,0 foi escolhido para utilização nos estudos seguintes.

5.3.2. Parâmetros para a otimização da resposta voltamétrica de estriol no eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs

Os efeitos dos parâmetros experimentais utilizando o eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs em PBS (pH 9,0) 0,1 mol L⁻¹ contendo 50,0 μmol L⁻¹ de estriol foram estudados por voltametria de pulso diferencial. O potencial de pré-tratamento e o tempo para limpar a superfície do eletrodo foram estudados em primeiro lugar, uma vez que a detecção eletroquímica do estriol foi acompanhada pela sua adsorção ou seus produtos de oxidação. Assim, existe um envenenamento da superfície do eletrodo e consequente diminuição do sinal analítico. Potenciais de pré-tratamento, valores de 0,0, -0,2, -0,4, -0,6, -0,8, -1,0, -1,1 e -1,2 V

foram investigados com o tempo de pré-tratamento fixado em 30 s (**Figura 38 (A)**). Cerca de 95% da resposta original foi recuperada nos potenciais de -1,0 e -1,1V. Nos potenciais de limpeza mais positivos, a corrente de pico anódica obtida durante o experimento seguinte começou a diminuir significativamente. Assim, -1.0 V foi escolhido como o potencial de limpeza de pré-tratamento nos estudos posteriores.

Figura 38. Otimização dos parâmetros utilizados na determinação de estriol ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de concentração) utilizando DPV em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS, pH 9,0: (A) Efeito do potencial de pré-tratamento sobre a corrente de pico de oxidação de estriol e (B) A dependência da corrente de pico de oxidação de estriol e porcentagem de SbCl_3 na composição do eletrodo composto.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015¹¹⁹.

A influência do tempo de pré-tratamento também foi avaliada estudando a variação de 30 a 240s com um potencial de pré-tratamento de -1,0V. A recuperação completa do sinal

analítico foi obtida entre 60 e 240 s. Como 60 s é um tempo mais curto, este foi escolhido como a duração do pré-tratamento para limpar a superfície do eletrodo.

A seguir foi investigada a influência da composição do material do eletrodo. Nesta etapa do estudo, a quantidade de GO utilizada na síntese foi fixada e a quantidade de SbCl_3 foi variada nas seguintes proporções: 10%, 20%, 30%, 40% e 45% (*m/m*). Na **Figura 38** (B), se observa que o pico de corrente anódica aumentou com a quantidade de SbCl_3 no compósito até 40% (*m/m*), depois diminuiu quando uma maior quantidade de SbCl_3 foi utilizada. Este comportamento foi, provavelmente, devido à formação de aglomerados de SbNPs quando uma maior quantidade de SbCl_3 foi utilizada na síntese do composto rGO-SbNPs. Com base nestes resultados, 40% (*m/m*) de SbCl_3 foi utilizado em todos os eletrodos preparados para a análise de estriol.

A influência dos parâmetros de DPV foram então estudados. Em primeiro lugar, o efeito da velocidade de varredura foi estudado na faixa de 2,5 a 15 mV s^{-1} , com o passo de potencial constante a 2 mV e a amplitude de pulso de 100 mV. A velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} foi escolhida porque apresentou maior corrente de pico anódica. As velocidades de varredura de potenciais superiores causaram uma perda na definição de pico e menor corrente de pico anódica para oxidação de estriol. Em seguida foi avaliado o efeito da amplitude com o passo de potencial constante a 2 mV e a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} variando-se a amplitude de pulso de 10 a 100 mV. Não foi observado incremento significativo dos picos para a oxidação de estriol, mesmo em amplitudes superiores a 50 mV. Uma vez que as correntes de pico foram proporcionais ao aumento da amplitude, 100 mV foi escolhida como o valor otimizado para a amplitude de pulso na DPV. Por fim, com a amplitude de pulso, foi mantida constante em 100 mV e a velocidade de varredura em 10 mV s^{-1} , foi estudado o efeito do incremento de potenciais dentro da faixa de 1 a 10 mV. Para incrementos de potenciais maiores do que 2 mV, a deformação dos perfis voltamétricos foi observado e o pico de corrente anódica para o estriol diminuiu, e assim um incremento de potencial de 2 mV foi escolhido.

5.3.3. Comparação do comportamento voltamétrico de estriol nos eletrodos modificados

Os experimentos foram realizados por voltametria de pulso diferencial na faixa de potenciais de 0,0 a 1,0 V vs Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L^{-1}) em PBS (pH 9,0) 0,1 mol L^{-1} contendo 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol para os seguintes eletrodos: GC (curva a), GC/GO (curva b), GC/rGO (curva c) e GC/rGO-SbNPs (curva d), como mostrado na **Figura 39**.

Figura 39. Voltamogramas de DPV obtidos sob os parâmetros otimizados em 0,1 mol L⁻¹ de PBS, pH 9,0, contendo 50,0 μmol L⁻¹ de estriol para os seguintes eletrodos: (a) GC, (b) GC/GO, (c) GC/rGO e, (d) GC/rGO-SbNPs.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015 ¹¹⁹.

Os perfis voltamétricos obtidos, em todos os eletrodos estudados, apresentaram potencial de oxidação em 0,45 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹). No entanto, o eletrodo GC/rGO-SbNPs (curva d), apresentou maior intensidade de corrente anódica para o estriol em comparação com a corrente observada para os outros eletrodos. A oxidação do estriol no eletrodo modificado com GC/rGO-SbNPs apresentou um aumento por um fator de 1,4 vezes em incremento de corrente de pico, quando comparado com o eletrodo que foi preparada contendo apenas rGO (curva c). Assim, uma combinação sinérgica de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de antimônio podem ser observadas, o que leva a um aumento na corrente de pico para a oxidação de estriol. No que se refere ao eletrodo de GC/GO (curva b), um incremento em um fator de 2,0, foi observado para a oxidação de estriol. Quando utilizado o eletrodo de GC, em comparação com o eletrodo GC/rGO-SbNPs, foi observado um aumento ainda maior, isto é, um fator de 7,8 para a oxidação de estriol. O incremento dos valores de corrente se relacionam com o aumento da área eletroativa da superfície do composto rGO-SbNPs formado. Esses resultados evidenciaram que o eletrodo composto

GC/rGO-SbNPs é altamente promissor na determinação de estriol, e os dados fornecem subsídios para futuros estudos de outros interferentes endócrinos.

5.3.4. Determinação de estriol na presença de possíveis interferentes

A capacidade para determinar o estriol na presença de outros compostos orgânicos em águas residuais, incluindo pesticidas e antibióticos foram investigados. O pesticida estudado foi o carbaril e o antibiótico foi o trimethoprim (TMP). O carbaril é um inseticida usado em abundância na agricultura, por isso está presente como contaminante em águas residuárias. O antibiótico trimethoprim é comumente administrado para tratar de uma infecção (por exemplo), assim sendo, este antibiótico acumula-se com o hormônio administrado diariamente. Os experimentos de DPV foram realizados na faixa de potenciais de 0,0 a 1,4 V vs. Ag/AgCl/KCl (3,0 mol L⁻¹) em 0,1 mol L⁻¹ de PBS, pH 9,0, contendo uma concentração fixa de estriol (50,0 µmol L⁻¹) e adições de carbaril e TMP de 25,0, 50,0 e 100 µmol L⁻¹. Em todos os estudos em DPV não foi observada nenhuma sobreposição entre o pico de oxidação do estriol e os picos de oxidação das substâncias interferentes estudadas. Além disso, a grande separação dos potenciais de pico permite, pela primeira vez, uma possível determinação seletiva e simultânea de carbaril, estriol e TMP na mistura. Os potenciais de pico de oxidação de carbaril, estriol e TMP foram determinados no eletrodo compósito de GC/rGO-SbNPs com potenciais de pico em 0,30, 0,48 e 1,14 V, respectivamente.

Na faixa de concentrações estudada de carbaril e TMP, a variação da altura de picos de corrente foi negligenciável. A recuperação média de estriol obtida foi de 96,3% e 98,7% para 25,0, 50,0 e 100 µmol L⁻¹ de carbaril e TMP, respectivamente, adicionados a cada medida. Além disso, as substâncias interferentes não deslocou significativamente o potencial de oxidação de estriol, indicando que o sinal analítico não sofreu interferência destes compostos orgânicos das águas residuais.

5.3.5. Características analíticas

Os experimentos de DPV foram realizados em triplicata, utilizando os parâmetros experimentais otimizados para obter uma curva analítica na determinação de estriol com o eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs. A resposta analítica, observada na **Figura 40**, apresenta resposta linear na faixa de concentrações de 0,20 a 1,4 µmol L⁻¹, conforme a seguinte equação:

$$I_{pa} \text{ (nA)} = 0.57 \text{ (nA)} + 2.13 \text{ (nA/}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)} [\text{estriol}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$$

apresentando um coeficiente de correlação de 0,998 ($n = 7$). O limite de detecção (LOD) obtido foi de $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$ ($0,14 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), que foi determinado utilizando uma relação $3\sigma/\text{inclinação}$, onde σ é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas obtidos no sinal analítico na ausência de estriol.

Figura 40. Voltamogramas de DPV em relação ao eletrodo composto GC/rGO-SbNPs, obtidos com os parâmetros otimizados. As concentrações de estriol em $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram: (a) 0,20, (b) 0,40, (c) 0,60, (d) 0,80, (e) 1,0, (f) de 1,2, e (g) 1.4. Destaque: dependência linear das correntes de picos com as concentrações de estriol.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015 ¹¹⁹.

Comparando os resultados obtidos em resposta ao eletrodo composto GC/rGO-SbNPs com outros métodos eletroquímicos na determinação de estriol, um maior LOD de $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foi observado em um estudo em que se utilizou eletrodo de diamante dopado com boro ⁸⁰. Outro estudo também apresentou um LOD mais alto, de 620 nmol L^{-1} , utilizando-se um eletrodo de GC modificado com Pt-nano-clusters e nanotubos de carbono de paredes múltiplas ⁸¹. Utilizando um sistema de imunoensaio eletroquímico, um LOD de $0,33 \text{ ng mL}^{-1}$ para o estriol foi determinado ⁷⁷, que apresentou um valor mais elevado do que o método proposto. Um LOD ligeiramente superior, de $1,3 \text{ nmol L}^{-1}$ foi determinado utilizando um sensor de fluorescência baseado em GO como relatado por Kushwaha *et al.* ¹²⁴. Por

consequente, o novo material baseado na combinação sinérgica de rGO e SbNPs na determinação do hormônio estriol apresentou o melhor LOD relatado na literatura até o momento, para o nosso conhecimento.

5.3.6. Análise do hormônio estriol em águas naturais

O eletrodo modificado com o material compósito GC/rGO-SbNPs foi utilizado para a quantificação de estriol em uma amostra de água natural. Para isso, quantidades conhecidas de solução padrão de estriol foram adicionadas a uma alíquota de 10 ml de água natural a partir de uma represa situada em São Carlos (São Carlos / SP-Brasil), obtendo-se uma concentração final de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol. Esta amostra foi misturada com 10 mL de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0. Nenhum tratamento adicional da amostra foi realizado. O teor de estriol foi determinado por três adições sucessivas de alíquotas da solução padrão de estriol. As concentrações utilizadas na determinação de estriol foram realizadas em triplicata, sem qualquer processo de tratamento, utilizando-se o método de adição de padrão. Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos são correspondentes para a análise da amostra de água natural, apresentados na **Figura 41** (A), juntamente com as respectivas concentrações utilizadas na adição de padrões. Os resultados obtidos (média $\pm$ SD) para três determinações foram: $0,487 \pm 0,004 \mu\text{mol L}^{-1}$ estriol. As recuperações obtidas para o estriol foram entre 96,7% e 102,6% em amostras de água natural ($n = 3$), obtidas para as amostras enriquecidas com concentrações de 0,70, 0,80 e $0,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol. As análises de estriol nas amostras de água natural também foram realizadas por cromatografia (HPLC). Nos cromatogramas apresentados na **Figura 41** (B), referente à amostra de água natural enriquecida com $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol (sinal S), um pico foi observado com um tempo de retenção de estriol em 4,7 min.

Figura 41. (A) DPV obtidos utilizando o eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs na determinação de estriol em água natural: (S) amostra; (a) amostra enriquecida com $0,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol; (b) amostra enriquecida com $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol; (c) amostra enriquecida com $0,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol. Destaque: dependência linear dos picos de corrente com concentrações de estriol. (B) Cromatogramas para a amostra de água natural antes (curva B) e após (curva S) enriquecida com $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol.

Fonte: Cesarino, I., Cincotto, F. H. *et al.*, 2015 ¹¹⁹.

Os resultados obtidos para a amostra usando o método proposto foram comparados com aqueles para as mesmas amostras utilizando HPLC, e esses resultados estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Resultados na determinação de estriol em amostras naturais de água (enriquecida com estriol) pelo método eletroquímico (DPV) e utilizando HPLC.

Estriol ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			Erros relativos (%)	
Repetição	DPV	HPLC	$ E_1 ^b$	$ E_2 ^c$
1	0,483	0,512	3,4	5,7
2	0,491		1,8	4,1
3	0,487		2,6	4,9
média $\pm$ SD	$0,487 \pm 0,004$			

^a Concentração de estriol enriquecida: $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

^b E_1 : DPV vs. Concentração adicionada (DPV-adição/adicação) x 100%

^c E_2 : DPV vs. HPLC (DPV-HPLC/HPLC) x 100%

Não houve diferenças significativas entre a concentração adicionada e as concentrações obtidas por HPLC em comparação com o método eletroanalítico, indicando que o eletrodo modificado com o compósito GC/rGO-SbNPs pode ser utilizado na determinação de estriol em amostras naturais de água sob as condições otimizadas estudadas.

5.3.7 Considerações gerais

Uma nova modificação em eletrodo de carbono vítreo foi desenvolvida com base na combinação sinérgica de nanopartículas de óxido de antimônio e grafeno reduzido, que pode ser utilizado para a determinação de estriol em amostras ambientais. O material compósito rGO-SbNPs foi caracterizado com sucesso por microscopia FEG-SEM e eletroquimicamente, que indicou que o GO foi reduzido e que o rGO foi modificado com as nanopartículas antimônio. Utilizando os parâmetros otimizados, com o eletrodo GC modificado com o compósito rGO-SbNPs foi possível obter o menor LOD relatado na literatura, melhorando assim a sensibilidade do eletrodo de carbono vítreo na análise de estriol.

Finalmente, o eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs foi aplicado com sucesso na determinação do hormônio estriol em amostras de água naturais, o que sugere o seu uso em futuras aplicações nesta área.

5.4 Nanomaterial híbrido baseado em GO/Sb₂O₅/lacase para o desenvolvimento de um biossensor amperométrico na determinação de estriol

Um novo nanomaterial híbrido a base de grafeno/óxido de antimônio foi preparado por um processo de reação *in situ* (descrito previamente na *Sessão 4.7*). O nanomaterial foi bem caracterizado por diferentes espectroscopias, microscopias e métodos eletroquímicos, demonstrando por meio de microscopia de força atômica que as folhas de grafeno foram decoradas com uma fina película de óxido de antimônio. Um eletrodo de carbono vítreo recoberto com o material híbrido foi posteriormente utilizado como suporte para a imobilização covalente da enzima lacase no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para determinação de estriol.

O procedimento utilizado para preparar o nanomaterial híbrido e outro conjunto de eletrodo enzimático está apresentado no **Esquema 4**.

Esquema 4. Exibição esquemática das etapas envolvidas na preparação do nanohíbrido GO/Sb₂O₅ e o eletrodo enzimático Lac/GO/Sb₂O₅/GCE.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

O nanomaterial híbrido foi caracterizado por espectroscopia, microscopia e métodos eletroquímicos. Análise por espectros de raios-X de fotoelétrons (XPS) foi usado para obter informação sobre as espécies químicas e os estados de oxidação do antimônio no material híbrido. A **Figura 42** representa os espectros de XPS obtidos para o nanomaterial e os valores de energia de ligação para Sb3d_{3/2}, Sb3d_{5/2}, O1s, Sb4d e C1s estão apresentados na **Tabela 5**.

Figura 42. Espectros XPS obtidos do material híbrido GO/Sb₂O₅.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015 ¹²⁵.

Tabela 5. Resumo dos valores de energia de ligação em elétron-volts (eV) para Sb3d3/2, Sb3d5/2 O1s, Sb4d e C1s componentes do material GO/Sb₂O₅.

Amostra	C1s	Sb3d _{3/2}	Sb3d _{5/2}	O1s	Sb4d
GO/Sb ₂ O ₅	284.6 287.0 289.2	540.4	530.9	532.5	34.4
Sb ₂ O ₅ ^{a,b}		540,5	530,9	532.4	35,2
Sb ₂ O ₃ ^c		539,7	530,7		
GO ^{d,e,f}	284.7 287.5 288.7			532.9	

Referências: a) ¹²⁶ b) ¹²⁷ c) ¹²⁸ d) ³³ e) ¹²⁹ f) ¹³⁰

O sinal obtido referente à energia de ligação de oxigênio (O1s) sobrepõe-se o valor da energia de ligação para o componente Sb3d_{5/2}. A deconvolução do espectro apresenta o valor de 534,2 eV, relacionado com a componente Sb3d_{5/2} e o valor de 532,5 eV pode ser atribuída a componente O1s. Para confirmar a formação de antimônio (V), também foram realizadas a análise das componentes Sb3d_{3/2} e Sb4d. Os valores obtidos para as energias de ligação de Sb3d_{3/2} e Sb4d foram 540,4 eV e 34,4 eV, respectivamente. Esses valores foram semelhantes aos de óxido Sb₂O₅ puro, confirmando a formação de óxido de antimônio (V) nas folhas de GO. A ausência de energias de ligação para as componentes Sb3d_{3/2} e Sb3d_{5/2} em torno de 539,7 eV e 530,7 eV também confirmou que o óxido de antimônio (III) não foi formado no nanomaterial. A deconvolução da componente C1s apresentou três valores de energia de

ligação (284,6 eV, 287 eV e 289,2 eV), indicando que a GO foi modificado com diferentes grupos funcionais. O valor da energia de ligação em torno de 284,6 eV está relacionada com a presença de grupos hidroxilo ligada à estrutura do carbono, a energia de ligação em torno de 287 eV confirma a presença de radicais carbonila e a energia de ligação em torno de 289,2 eV pode ser atribuído aos grupos carboxila sobre as arestas de GO^{88; 129}.

Figura 43. Imagem TEM de GO (A) e GO/Sb₂O₅ (B). Imagem HRTEM de GO/Sb₂O₅ (C). Análise elementar (D) e área selecionada padrão de difração de elétrons (no detalhe) de GO/Sb₂O₅.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

O estudo microestrutural e morfológico do material híbrido GO/Sb₂O₅ foi conduzido por TEM, FEG-SEM e AFM. A **Figura 43** mostra a imagem representativa TEM de GO antes (A) e depois da modificação com Sb₂O₅ (B). O nanomaterial modificado mostrou claramente as zonas escuras que são homogeneamente dispersos na folha planar GO, sugerindo uma alta cobertura com Sb₂O₅. A presença deste óxido de metal na base nanohíbrido-GO foi confirmada por análise elementar usando espectroscopia por dispersão de energia (EDS), como é ilustrada na **Figura 43** (D). O Sb₂O₅ formado nas folhas GO apresenta-se de forma amorfa, como confirmado pela área selecionada de difração de elétrons (SAED) (inserida na **Figura 43** (D)). É bem conhecido que a estrutura amorfa do Sb₂O₅ é caracterizada pela

presença de sítios ácidos de Lewis e de Bronsted na superfície do material ¹³¹, conferindo assim excelentes propriedades para a nanohíbrido GO/Sb₂O₅ na imobilização de biomoléculas.

Figura 44. Imagens de FEG-SEM de (A) GO/Sb₂O₅ e (B) Lac/GO/Sb₂O₅.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015 ¹²⁵.

No entanto, deve-se ressaltar que a presença de material nanoestruturado Sb₂O₅ não foi evidenciada por TEM e análise HRTEM (**Figura 43** (C)). Análise semelhante foi efetuada por análise por FEG-SEM (**Figura 44** (A)), sugerindo que Sb₂O₅ estava presente como estruturas muito pequenas, mesmo atômicas sobre o nanohíbrido.

Figura 45. Imagem obtida com o AFM e análise da secção indicada como uma linha preta para GO/Sb₂O₅.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015 ¹²⁵.

A **Figura 45** mostra a análise topológica do nanohíbrido GO/Sb₂O₅ por AFM. O nanomaterial mostrou duas zonas diferentes com topologia bem definida. A zona não modificada apresentou a morfologia semelhante a plaquetas característica de GO com 0,8-1,0 nm de espessura, de acordo com o relatado para este material ¹³². No entanto, observou-se um aumento notável na espessura do nanomaterial na zona modificada, como revelado pelos perfis de AFM. Este fato sugere a presença de uma elevada densidade de nanoestruturas Sb₂O₅ cerca de 1,5-2,2 nm na superfície GO.

5.4.1 Resposta do biossensor eletroquímico enzimático na determinação de estriol

O nanohíbrido GO/Sb₂O₅ foi empregado como material de modificação para GCE para construir um biossensor eletroquímico enzimático para determinação de estriol. A imobilização de lacase sobre o eletrodo modificado produz uma superfície mais amorfa, conforme revelado pela análise por FEG-SEM (**Figura 44**). Este fato sugere alta carga de moléculas de proteínas enzimáticas no nanomaterial híbrido à base de grafeno. A alta resposta eletroanalítica observada para o eletrodo enzimático foi obtida pela modificação da superfície do material híbrido com 3 mg mL⁻¹ de lacase (**Figura 46**) adicionando 10 µL de 3% (v/v) de glutaraldeído (**Figura 47**).

Figura 46. Efeito da concentração de lacase sobre a resposta do biossensor amperométrico mantendo-se constante a concentração de estriol em 10 µmol L⁻¹ de PBS (pH 7) 0,1 mol L⁻¹. Potencial de trabalho: -0.3V vs. Ag/AgCl.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015 ¹²⁵.

Figura 47. Efeito da concentração de glutaraldeído na resposta amperométrica de estriol na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH 7). Potencial de trabalho: -0.3V vs. Ag/AgCl .

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

A montagem deste eletrodo enzimático foi estudada por espectroscopia de impedância electroquímica (EIE), e os diagramas de Nyquist resultantes são mostrados na **Figura 48**. Um semicírculo de diâmetro muito baixo em altas frequências foi observado no espectro do GCE limpo, indicando uma baixa resistência à transferência de elétrons a esta interface. A modificação do eletrodo com o nanohíbrido de grafeno resultou em um pequeno aumento na resistência de transferência de elétrons, como revelado pelo pequeno aumento no diâmetro do semicírculo (de 132 para 157Ω) em altas frequências no espectro de impedância electroquímica. Este fenômeno pode ser atribuído às altas propriedades condutoras do nanomaterial híbrido à base de grafeno. O aparecimento de um segundo semicírculo neste espectro sugere o eletrodo recoberto com o nanomaterial híbrido apresenta uma interface electroquímica não homogênea. Este comportamento EIE poderia ser justificado pela distribuição não homogênea de Sb_2O_5 na GO, como revelado pela análise AFM. Finalmente, o eletrodo Lac/GO/ Sb_2O_5 /GCE apresentou um notável aumento na resistência de transferência de elétrons (912Ω), o que sugere uma alta cobertura da superfície do eletrodo pelas moléculas de proteína lacase, de acordo com a análise FEG-SEM.

Figura 48. Os espectros de impedância eletroquímica obtidos em um eletrodo de carbono vítreo, antes (a) e após a modificação com GO/Sb₂O₅ (b), e ainda a imobilização de lacase (c), em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1).

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

A atividade eletrocatalítica do eletrodo enzimático Lac/GO/Sb₂O₅/GCE para o estriol foi estudada através de voltametria cíclica em PBS a 0,1 mol L⁻¹, pH 7, na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de tionina como mediador eletroquímico. GCE, GO/Sb₂O₅/GCE modificado com lacase foram empregados como eletrodos de controle. Como pode ser observado na **Figura 49**, o Lac/GCE mostrou apenas um pequeno aumento na transformação eletrocatalítica de estriol, como revelado pelo aumento pequeno na corrente catódica em valores de potencial mais baixo do que -200 mV, sugerindo baixo carregamento da enzima nesta superfície do sensor. Foram observados valores mais elevados de correntes catódicas para o eletrodo GO/Sb₂O₅/GCE em valores de potencial menor do que -100 mV, demonstrando as excelentes propriedades eletrocatalíticas do nanomaterial híbrido baseado em GO. No entanto, o biossensor Lac/GO/Sb₂O₅/GCE apresentou melhor resposta eletrocatalítica na determinação de estriol em comparação aos outros eletrodos. Estes resultados confirmam a hipótese de utilização de uma combinação de lacase e o nanohíbrido-GO para conceber um dispositivo biossensor para este hormônio.

Figura 49. Voltamogramas cíclicos obtidos para CGE (a), Lac/GCE (b), GO/Sb₂O₅/GCE (c) e Lac/GO/Sb₂O₅/GCE (d) em 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, na presença de 1 mmol L⁻¹ de tionina, a velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

5.4.2 Otimizações dos parâmetros experimentais

As condições de trabalho para o biossensor foram ainda otimizadas através da determinação do efeito dos diferentes parâmetros sobre a resposta eletroanalítica do eletrodo enzimático.

A tionina é um mediador eletroquímico à base de fenotiazina amplamente utilizada para conceber biossensores para compostos fenólicos¹³³, e assim, foi avaliado em nossos estudos para a quantificação de estriol. Resposta eletrocatalítica elevadas foram observadas utilizando tionina a 1,0 mmol L⁻¹ concentração final, apresentada na **Figura 50**, e consequentemente, novos experimentos foram realizados sob esta condição.

Figura 50. Efeito da concentração de tionina na resposta amperométrica de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH 7,0). Potencial de trabalho: $-0,3\text{V vs. Ag/AgCl}$.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

A influência do pH (**Figura 51**) e potencial aplicado na resposta amperométrica do eletrodo de trabalho (**Figura 52**) foram determinadas.

Figura 51. Corrente (i) versus o intervalo de pH mantendo a concentração de estriol fixada em $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de tionina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Condições experimentais: potencial aplicado $-0,3 \text{ V}$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato, pH 7.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

Respostas eletroanalíticas mais altas foram observadas ao utilizar a solução tamponada de pH 7,0, assim como o potencial de trabalho aplicado definindo em -300 mV, podendo ser observado na **Figura 52**.

Figura 52. Efeito do potencial de trabalho aplicado na resposta do biossensor amperométrico, em presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH 7,0) e tionina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$).

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

5.4.3 Características analíticas

O eletrodo enzimático foi, em seguida, utilizado para a quantificação amperométrica de estriol. Na **Figura 53** está apresentada a resposta do biossensor amperométrico depois de adições contínuas de hormônio. O biossensores exibiu rápida resposta analítica (4s) e um aumento na corrente catódica a -300 mV com a adição contínua de estriol.

Figura 53. Típica curva de resposta corrente-tempo em sucessivas adições de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de estriol na presença de $1,0$ mmol L^{-1} tionina em $0,1$ mol L^{-1} PBS (pH 7). A faixa de concentração de estriol foi de $0,025 - 1,025$ $\mu\text{mol } L^{-1}$.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵

Na **Figura 54** observa-se a corrente de estado constante medida, obtendo-se assim, uma dependência linear ($r = 0,9990$) com a concentração de estriol na faixa de 25 nM a $1,03$ $\mu\text{mol } L^{-1}$, de acordo com a seguinte equação:

$$i_c(\text{mA}) = 275 \times c(\text{estriol}/\text{M}) + 6,0 \times 10^{12}$$

O limite de detecção para este biossensor foi estimado de acordo com a especificação da IUPAC¹³⁴, e o valor obtido foi de 11 nmol L^{-1} .

Figura 54. Curva de calibração do biossensor GCE/GO/Sb₂O₅/lacase para o estriol.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015 ¹²⁵.

Na **Tabela 6** se observa os resultados da comparação do GCE/GO/Sb₂O₅/lacase biossensor com outros métodos eletroquímicos para determinação de estriol.

Tabela 6. Comparação do biossensor GCE/GO/Sb₂O₅/lacase frente a literatura.

material	limite de detecção	referência
eletrodo de diamante dopado com boro	$1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	⁸⁰
Nanotubos de carbon modificado com nanoclusters de platina	$6,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	⁸¹
Biossensor baseado em híbrido de nanopartículas de F ₃ O ₄ /quitosana/tirosinase	$2,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	¹³⁵
GCE/GO/Sb ₂ O ₅ /lacase	$1,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	presente trabalho

Por conseguinte, o biossensor GCE/GO/Sb₂O₅/lacase, comparado com resultados obtidos em outros trabalhos reportados na literatura, apresentou o melhor limite de detecção na determinação de estriol.

O efeito de quatro espécies (hidroquinona, catecol, dopamina e ácido ascórbico), consideradas como potenciais interferentes, foram estudadas sobre a resposta eletroanalítica do biossensor. Na **Figura 55** se observa a não perturbação no comportamento cronoamperométrico do eletrodo enzimático após a adição de hidroquinona, catecol, dopamina e ácido ascórbico.

Figura 55. Corrente (i) em função do tempo em adições de dopamina, catecol, hidroquinona, ácido ascórbico e o estriol na célula electroquímica nos tempos de 500, 590, 660 e 720 s. Concentrações (em mol L⁻¹) dos analitos na célula eletroquímica: A [dopamina] = 10×10^{-5} , B [catecol] = 10×10^{-5} ; C [hidroquinona] = 10×10^{-5} , D [ácido ascórbico] = 10×10^{-5} , E [estriol] = 10×10^{-6} , A' [dopamina] = 20×10^{-5} , B' [catecol] = 20×10^{-5} ; C' [hidroquinona] = 20×10^{-5} , D' [ácido ascórbico] = 20×10^{-5} , F [estriol] = 20×10^{-6} mol L⁻¹. Condições experimentais: potencial aplicado -0,3 V, 0,1 mol L⁻¹ de solução de PBS a pH 7, em presença de 1,0 mmol L⁻¹ tionina.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

No entanto, foi observado um aumento rápido e notável na corrente catódica quando o estriol foi adicionado para a célula eletroquímica, demonstrando, assim, que a presença destas espécies não afetou a determinação eletroanalítica de estriol.

O biossensor GCE/GO/Sb₂O₅/lacase foi finalmente aplicado para determinar o estriol em amostras de urina humana para validar a sua utilização na caracterização analítica em

amostras reais. A quantidade de estriol foi estimada por triplicata usando o método da adição de padrão para minimizar o efeito da matriz. A preparação das amostras consistiu na diluição a partir do volume apropriado de amostra de urina com etanol para um volume final de 5 mL; nenhum outro pré-tratamento foi necessário. A amostra de urina foi obtida de uma voluntária saudável, que consumia pílula contraceptiva, em dias diferentes (A e B) e os resultados estão resumidos na **Tabela 7**.

Além disso, o estriol foi determinado em amostras de água (Canal de Isabel II, Madrid, Espanha). A quantidade de estriol foi estimada por triplicata, análoga às amostras de urina. Os resultados obtidos estão resumidos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Relação dos resultados obtidos da análise em amostras reais de urina e água.

Amostra	fortificado (mmol L ⁻¹)	encontrado (mmol L ⁻¹)	recuperação (%)
Urina A	-	0,115	-
Urina A	0,086	0,201	100,1 ± 1
Urina B	-	0,102	-
Urina B	0,086	0,188	100,2 ± 1
Água	-	~ 0	-
Água	0,330	0,330	99,9 ± 1

A relação direta foi observada para o valor de corrente catódica e concentração de estriol com uma alta correlação para todos os casos ($r = 0,999$). Recuperações cerca de $100 \pm 1\%$ de estriol em amostras de urina humana ($n = 3$) foram obtidas para amostras depois de enriquecidas com $86 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos nas amostras de água foram semelhantes aos obtidos para as amostras de urina e foram calculadas por três alíquotas depois de enriquecida com $0,330 \mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol. As recuperações obtidas foram de 99,5 a 100,6% de estriol em amostras de água. Estes resultados sugerem que o biossensor Lac/GO/Sb₂O₅/GCE pode ser empregado com sucesso para determinar estriol em amostras reais.

A repetibilidade do biossensor foi estimada medindo dez adições sucessivas de $10 \mu\text{M}$ de estriol. O RSD resultante de 2,84% indica uma boa repetibilidade para este biossensor. Por outro lado, a reprodutibilidade do processo de montagem foi estudada através do emprego de cinco eletrodos diferentes. O RSD de 4,37% obtido no estado estacionário em adição de 10

$\mu\text{mol L}^{-1}$ de estriol demonstrou alta confiabilidade para o processo de fabricação do biossensor.

A estabilidade em longo prazo do biossensor foi avaliada medindo a sua resposta eletroanalítica a adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ estriol durante 2 meses de armazenamento a 4°C sob condições secas. O biossensor apresentou boas propriedades de estabilidade, retendo cerca de 84% da sua atividade original depois de 1 mês de armazenagem (**Figura 56**).

Figura 56. Percentagem obtida na determinação do estriol pelo decréscimo da resposta de corrente do biossensor para 0, 1, 2, 7, 15, 20 e 30 dias.

Fonte: Cincotto, F. H., *et al.*, 2015¹²⁵.

No entanto, sua resposta eletrocatalítica diminuiu gradualmente cerca de 50% após 2 meses de armazenamento. Esta boa estabilidade poderia ser atribuída à proteção da estrutura ativa da enzima lacase mediante a imobilização do material nanohíbrido, o que também pode proporcionar um microambiente adequado para a atividade catalítica da enzima.

5.4.4 Considerações gerais

Um novo nanomaterial híbrido elétrico condutivo foi preparado pelo recobrimento de grafeno com um filme ultrafino de Sb_2O_5 através de um esquema de reação *in situ*. A modificação das folhas de grafeno com Sb_2O_5 foi confirmada por análise de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, microscopia eletrônica e de transmissão, e espectroscopia de raios-X de energia dispersiva. O nanohíbrido $\text{GO/Sb}_2\text{O}_5$ apresentou excelentes

propriedades como suporte para a imobilização covalente da enzima lacase por meio de um processo de *cross-linking* mediada por glutaraldeído. Esta estratégia de imobilização foi empregada para criar um biossensor enzimático nanoestruturado para a determinação amperométrica de estriol. O efeito sinérgico de GO, óxido de Sb(V) e lacase permitiu rápida e alta resposta eletrocatalítica na interface de determinação de estriol, resultando em uma alta sensibilidade, excelente seletividade e baixo limite de detecção para o biossensor.

O biossensor GCE/GO/Sb₂O₅/laccase foi aplicado com sucesso para a determinação rápida de estriol em urina humana e em amostras de água apresentando elevado desempenho. Estes resultados sugerem que este novo nanomaterial híbrido baseado em grafeno e lacase pode ser útil para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a determinação de estriol em amostras clínicas e ambientais.

Capítulo 6 - Conclusões

Tendo como base as considerações gerais, apresentadas no Capítulo 5, foi possível fazer uma conclusão geral da utilização do desenvolvimento, caracterização e da aplicação de grafeno e suas modificações em sensores e biossensores eletroquímicos.

Um novo nanomaterial baseado em *quantum dots* de CdTe suportados sobre a superfície de óxido de grafeno oxidado foi utilizado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para determinação de 17 β -estradiol. O nanohíbrido GO/CdTe foi caracterizado com sucesso utilizando as técnicas de TEM, DLS, espectrofotometria de UV-Vis e fluorescência, Raman e técnicas voltamétricas. Estas caracterizações mostraram claramente que partículas de CdTe possuíram um tamanho médio de 3,10 nm e encontraram-se suportadas sobre a superfície do GO. As propriedades eletrônicas do óxido de grafeno aliadas ao efeito fotoeletrocatalítico dos QDs mostraram grande eficiência na eletro-oxidação do hormônio 17 β -estradiol na presença e ausência de luz. Adicionalmente, o nanohíbrido pode ser armazenado durante dois meses sem perder suas propriedades. Finalmente, o efeito sinérgico entre o grafeno oxidado e os *quantum dots* de CdTe forneceram valores para o LOD em níveis nanomolar, além de melhorar a reprodutibilidade e repetibilidade das análises.

Outro material nanocompósito foi preparado, pela primeira vez na literatura, *in situ* pela redução e decoração de óxido de grafeno com nanopartículas de ródio. Este nanomaterial foi utilizado para modificar o GCE e, em seguida, utilizado como plataforma para imobilizar a enzima lacase na superfície do eletrodo por meio de uma reação de ligação cruzada mediada por glutaraldeído. Este eletrodo enzimático foi utilizado no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a determinação do hormônio 17 β -estradiol, que exibiu elevada sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, sendo capaz de detectar o hormônio em níveis de concentração picomolar. Este biossensor eletroquímico foi utilizado com sucesso para detectar 17 β -estradiol em amostras reais e sintéticas de urina com altos valores de recuperação. Com estes resultados obtidos, sugerimos o uso deste nanomaterial 2D como uma excelente ferramenta para preparar biossensores enzimáticos à base de oxidase sensíveis e confiáveis para os compostos de desregulação endócrina.

Uma nova modificação em eletrodo de carbono vítreo foi desenvolvida com base na combinação sinérgica de nanopartículas de óxido de antimônio e grafeno reduzido, que pode ser utilizado para a determinação de estriol em amostras ambientais. Utilizando os parâmetros otimizados, com o eletrodo GC modificado com o compósito rGO-SbNPs foi possível obter o menor LOD relatado na literatura, melhorando assim a sensibilidade do eletrodo de carbono

vítreo na análise de estriol. Finalmente, o eletrodo compósito GC/rGO-SbNPs foi aplicado com sucesso na determinação do hormônio estriol em amostras de água naturais.

Um novo nanomaterial híbrido condutor elétrico foi preparado pelo recobrimento de grafeno com um filme ultrafino de Sb_2O_5 através de um esquema de reação *in situ*. O nanohíbrido GO/ Sb_2O_5 apresentou excelentes propriedades como suporte para a imobilização covalente da enzima lacase por meio de um processo de *cross-linking* mediada por glutaraldeído. Esta estratégia de imobilização foi empregada para criar um biossensor enzimático nanoestruturado para a determinação amperométrica de estriol. O efeito sinérgico de GO, óxido de Sb(V) e lacase permitiu rápida e alta resposta eletrocatalítica na interface de determinação de estriol, resultando em uma alta sensibilidade, excelente seletividade e baixo limite de detecção para o biossensor. O biossensor GCE/GO/ Sb_2O_5 /lacase foi aplicado com sucesso para a determinação rápida de estriol em urina humana e em amostras de água apresentando elevado desempenho. Estes resultados sugerem que este novo nanomaterial híbrido baseado em grafeno e lacase poderia ser útil para o desenvolvimento de dispositivos biossensores eletroquímicos para a determinação de estriol em amostras clínicas e ambientais.

A partir do desenvolvimento da presente tese, houve a implementação na linha de pesquisa no laboratório do Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME) da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, desde a síntese, caracterização e aplicação de grafeno e *quantum dots*, materiais estes de grande interesse acadêmico e tecnológico na atualidade.

Ao longo das discussões do trabalho, apresentados em diferentes capítulos e tópicos, se realçaram os principais objetivos alcançados obtendo-se plataformas desenvolvidas e comparadas com outras previamente descritas na literatura. Em geral, pode ser concluído que através das investigações realizadas, foram exploradas as possibilidades eletroanalíticas de materiais de atual interesse e impacto científico. Foram realizadas sínteses, caracterizações e imobilizações inovadoras de materiais, a fim de aperfeiçoar os dispositivos e métodos de determinação de hormônios competitivos com os procedimentos existentes de análise.

Finalmente, os sensores desenvolvidos demonstraram possíveis utilidades práticas para a aplicação em amostras reais (ambientais e clínicas) na determinação do hormônio 17β -estradiol e estriol estudados.

Perspectivas Futuras

Metodologias e Perspectivas Futuras

Os núcleos de CdTe, previamente sintetizados e caracterizados, serão utilizados para a síntese dos *quantum dots* CdTe/CdS (core-shell). CdS shell (casca) será depositado sobre os núcleos (core) de CdTe, contendo o mesmo ligante (ácido de tiol alquilo) para manter os QDs hidrofílicos.

Sob atmosfera de argônio e agitação magnética vigorosa, soluções de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, serão adicionadas alternadamente para a solução de CdTe previamente preparada, sob uma temperatura de 50 °C para preparar o CdTe/CdS, em seguida, a solução será transferida para o reator hidrotermal, aquecida e mantida a 100 °C durante 1 h para se obter os *quantum dots core/shell* de CdTe/CdS. Depois, o reator será resfriado naturalmente até à temperatura ambiente, a solução será precipitada com acetona e separada por centrifugação. O precipitado obtido será seco em dessecador e pressão reduzida.

Serão preparados materiais compósitos a base de grafeno oxidado, grafeno reduzido, nanopartículas metálicas e *quantum dots* para posterior modificação de eletrodos de carbono vítreo e vidro condutor (ITO e FTO). Serão preparados filmes finos alternadamente (*layer-by-layer*) gotejando suspensões dos materiais previamente sintetizados; serão preparadas suspensões contendo nanomateriais híbridos de grafeno/*quantum dots*, pela ligação química dos grupos carboxílicos presentes na extremidade dos QDs de CdTe/CdS para posterior modificação de eletrodos de carbono vítreo.

Para isto, propõe-se utilizar a técnica de análise fotoeletroquímica (photoelectrochemical analysis - PEC) para a determinação de hormônios em amostras de águas de abastecimento. Para isto, uma superfície de carbono vítreo e/ou vidro condutor (ITO ou FTO) serão modificadas com os materiais compósitos contendo *quantum dots* para a geração de fotocorrente após a excitação por luz na região do visível. Este fotossensor será caracterizado

por técnicas morfológicas (microscopias ótica, SEM-FEG, microscopia de transmissão), por técnicas eletroquímicas (impedância eletroquímica, voltametrias, entre outras) e por técnicas ópticas (absorção no UV-vis e por FTIR). Após a sua caracterização, ele será utilizado para a determinação de hormônios em soluções puras, de laboratório. Para isto, o aumento da fotocorrente observada devido à doação de elétrons do hormônio estudado, será quantificada e uma curva analítica será construída. Os resultados obtidos com este fotossensor serão comparados com aqueles obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. Finalmente, o fotossensor será utilizado para a detecção e quantificação de hormônios (estriol, estradiol, etinilestradiol, bisfenol A, entre outros) em amostras de águas de abastecimento, coletadas na estação de tratamento de águas, antes e após o processo de tratamento. As figuras de mérito desta metodologia serão calculadas e comparadas com as técnicas tradicionais para a detecção de hormônios nestas matrizes. Desta forma, o desenvolvimento de um fotossensor altamente sensível permitirá desenvolver uma metodologia precisa, de baixo custo, com potencial de miniaturização, com possibilidade de aplicação "*in situ*" e em tempo real para a determinação de interferentes endócrinos em água a ser servida à população.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

- 9 trabalhos publicados em anais e congressos (nacionais e internacionais)
 - 13 artigos publicados em revistas internacionais
1. CINCOTTO, FERNANDO H.; GOLINELLI, D. L. C. ; MACHADO, SERGIO A. S.; MORAES, F. C. Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide modified with palladium nanoparticles for determination of desipramine in urine samples. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 239, p. 488-493, 2017.
 2. POVEDANO, ELOY ; CINCOTTO, FERNANDO H. ; PARRADO, CONCEPCIÓN ; DÍEZ, PAULA; SÁNCHEZ, ALFREDO ; CANEVARI, THIAGO C. ; MACHADO, SERGIO A.S.; PINGARRÓN, JOSÉ M.; VILLALONGA, REYNALDO . Decoration of reduced graphene oxide with rhodium nanoparticles for the design of a sensitive electrochemical enzyme biosensor for 17 β -estradiol. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 89, p. 343-351, 2017.
 3. CINCOTTO, FERNANDO H.; MARTÍNEZ-GARCÍA, GONZALO ; YÁÑEZ-SEDEÑO, PALOMA ; CANEVARI, THIAGO. C. ; MACHADO, S.A.S. ; PINGARRÓN, JOSÉ M. . Electrochemical immunosensor for ethinylestradiol using diazonium salt grafting onto silver nanoparticles-silica-graphene oxide hybrids. *Talanta (Oxford)*, v. 147, p. 328-334, 2016.
 4. CANEVARI, THIAGO C. ; NAKAMURA, MARCELO ; CINCOTTO, FERNANDO H. ; DE MELO, FERNANDO M. ; TOMA, HENRIQUE E. . High performance electrochemical sensors for dopamine and epinephrine using nanocrystalline carbon quantum dots obtained under controlled chronoamperometric conditions. *Electrochimica Acta*, v. 209, p. 464-470, 2016.

5. CANEVARI, THIAGO CRUZ ; MACHADO, SERGIO A. S. ; CINCOTTO, FERNANDO HENRIQUE ; NAKAMURA, MARCELO ; TOMA, HENRIQUE E. . Efficient electrochemical biosensor for ethynylestradiol based on laccase enzyme supported on single wall carbon nanotubes decorated with nanocrystalline carbon quantum dots.. *Analytical Methods (Print)*, v. 8, p. 7259-7259, 2016.
6. CESARINO, IVANA ; CINCOTTO, FERNANDO H. ; MACHADO, SERGIO A.S. . A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 210, p. 453-459, 2015.
7. CINCOTTO, FERNANDO H.; CANEVARI, THIAGO C. ; MACHADO, SERGIO A.S. ; SÁNCHEZ, ALFREDO ; BARRIO, MARIA ASUNCIÓN RUIZ ; VILLALONGA, REYNALDO ; PINGARRÓN, JOSÉ M. . Reduced graphene oxide-Sb₂O₅ hybrid nanomaterial for the design of a laccase-based amperometric biosensor for estriol. *Electrochimica Acta*, v. 174, p. 332-339, 2015.
8. CANEVARI, THIAGO C. ; PRADO, THIAGO M. ; CINCOTTO, FERNANDO H. ; MACHADO, SERGIO A.S. . Immobilization of ruthenium phthalocyanine on silica-coated multi-wall partially oriented carbon nanotubes: Electrochemical detection of fenitrothion pesticide. *Materials Research Bulletin*, v. 76, p. 41-47, 2015.
9. CAMPOS, ANDERSON M. ; RAYMUNDO-PEREIRA, PAULO A. ; CINCOTTO, FERNANDO H. ; CANEVARI, THIAGO C. ; MACHADO, SERGIO A. S. . Sensitive determination of the endocrine disruptor bisphenol A at ultrathin film based on nanostructured hybrid material SiO₂/GO/AgNP. *Journal of Solid State Electrochemistry (Print)*, v. 20, p. 2503-2507, 2015.
10. CINCOTTO, FERNANDO HENRIQUE; CANEVARI, THIAGO CRUZ ; CAMPOS, ANDERSON MASSAHIRO DE ; LANDERS, RICHARD ; MACHADO, SERGIO

- A. S. . Simultaneous determination of epinephrine and dopamine by electrochemical reduction on the hybrid material SiO₂/graphene oxide content Ag nanoparticles.. Analyst (London. 1877. Print), v. 139, p. 4634-4640, 2014.
11. CANEVARI, THIAGO C. ; CINCOTTO, FERNANDO H. ; LANDERS, RICHARD ; MACHADO, SERGIO A.S. . Synthesis and characterization of α -nickel (II) hydroxide particles on organic-inorganic matrix and its application in a sensitive electrochemical sensor for vitamin D determination. Electrochimica Acta, v. 147, p. 688-695, 2014.
 12. CINCOTTO, FERNANDO H.; CANEVARI, THIAGO C. ; MACHADO, SÉRGIO A. S. . Highly Sensitive Electrochemical Sensor for Determination of Vitamin D in Mixtures of Water-Ethanol. Electroanalysis (New York, N.Y.), v. 26, p. n/a-n/a, 2014.
 13. CINCOTTO, F. H.; MORAES, F. C. ; MACHADO, S. A. S. . Graphene Nanosheets and Quantum Dots: A Smart Material for Electrochemical Applications. Chemistry - A European Journal, v. 20, p. 1-9, 2014.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- 1 RAHMAN, M. M.; BALKHOYOR, H. B.; ASIRI, A. M.; MARWANI, H. M. A gold electrode modified with silver oxide nanoparticle decorated carbon nanotubes for electrochemical sensing of dissolved ammonia. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 5, p. 1677-1685, 2016.

- 2 NISHIHARA, H.; KANAIZUKA, K.; NISHIMORI, Y.; YAMANOI, Y. Construction of redox- and photo-functional molecular systems on electrode surface for application to molecular devices. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 21-24, p. 2674-2687, 2007.

- 3 SUNDARMURUGASSAN, R.; GUMPU, M. B.; RAMACHANDRA, B. L.; NESAKUMAR, N.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. Simultaneous detection of monocrotophos and dichlorvos in orange samples using acetylcholinesterase-zinc oxide modified platinum electrode with linear regression calibration. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 230, p. 306-313, 2016.

- 4 SANTOS, M. C.; MIWA, D. W.; MACHADO, S. A. S. Study of anion adsorption on polycrystalline pt by electrochemical quartz crystal microbalance. **Electrochemistry Communications**, v. 2, n. 10, p. 692-696, 2000.

- 5 ZAZOU, H.; OTURAN, N.; SONMEZ-CELEBI, M.; HAMDANI, M.; OTURAN, M. A. Mineralization of chlorobenzene in aqueous medium by anodic oxidation and electro-fenton processes using pt or bdd anode and carbon felt cathode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 774, p. 22-30, 2016.

- 6 SVÍTKOVÁ, J.; IGNAT, T.; ŠVORC, L.; LABUDA, J.; BAREK, J. Chemical modification of boron-doped diamond electrodes for applications to biosensors and biosensing. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 248-256, 2016.

- 7 JU, W.; FAVARO, M.; DURANTE, C.; PERINI, L.; AGNOLI, S.; SCHNEIDER, O.; STIMMING, U.; GRANOZZI, G. Pd nanoparticles deposited on nitrogen-doped hopg: New insights into the pd-catalyzed oxygen reduction reaction. **Electrochimica Acta**, v. 141, p. 89-101, 2014.

- 8 CINCOTTO, F. H.; CANEVARI, T. C.; MACHADO, S. A. S. Highly sensitive electrochemical sensor for determination of vitamin d in mixtures of water-ethanol. **Electroanalysis**, v. 26, n. 12, p. 2783-2788, 2014.

- 9 DÜNDAR, E.; MÜLAZIMOĞLU, I. E.; ÖZKAN, E. Electrochemical and spectroelectrochemical investigation of the behaviors of hf, 3-hf, 6-hf, 3,6-dhf on glassy carbon electrode surfaces. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 17-22, 2011.

- 10 PENG, J.; FENG, Y.; HAN, X. X.; GAO, Z. N. Simultaneous determination of bisphenol a and hydroquinone using a poly(melamine) coated graphene doped carbon paste electrode. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 7, p. 2289-2296, 2016.

- 11 ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 21, n. 1, p. 7-28, 2009.
- 12 ILINOIU, E. C.; MANEA, F.; SERRA, P. A.; PODE, R. Simultaneous/selective detection of dopamine and ascorbic acid at synthetic zeolite-modified/graphite-epoxy composite macro/quasi-microelectrodes. **Sensors**, v. 13, n. 6, p. 7296-7307, 2013.
- 13 BARSAN, O. A.; HOFFMANN, G. G.; VAN DER VEN, L. G. J.; DE WITH, G. Single-walled carbon nanotube networks: The influence of individual tube-tube contacts on the large-scale conductivity of polymer composites. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 24, p. 4377-4385, 2016.
- 14 SAITO, N.; HANIU, H.; USUI, Y.; AOKI, K.; HARA, K.; TAKANASHI, S.; SHIMIZU, M.; NARITA, N.; OKAMOTO, M.; KOBAYASHI, S.; NOMURA, H.; KATO, H.; NISHIMURA, N.; TARUTA, S.; ENDO, M. Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 11, p. 6040-6079, 2014.
- 15 KAUR, N.; THAKUR, H.; KUMAR, R.; PRABHAKAR, N. An electrochemical sensor modified with poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-wrapped multi-walled carbon nanotubes for enzyme inhibition-based determination of organophosphates. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 7, p. 2307-2315, 2016.
- 16 MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PÉREZ, B.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing vi: Carbon nanotubes. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 826-838, 2005.
- 17 PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 4, p. 217-224, 2009.
- 18 NOVOSELOV, K. S. Graphene cracking bilayers. **Nature Physics**, v. 5, n. 12, p. 862-863, 2009.
- 19 NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.
- 20 LOH, K. P.; BAO, Q. L.; ANG, P. K.; YANG, J. X. The chemistry of graphene. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 2277-2289, 2010.
- 21 LI, D.; MULLER, M. B.; GILJE, S.; KANER, R. B.; WALLACE, G. G. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 101-105, 2008.

- 22 GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.
- 23 HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.
- 24 SZABO, T.; BERKESI, O.; FORGO, P.; JOSEPOVITS, K.; SANAKIS, Y.; PETRIDIS, D.; DEKANY, I. Evolution of surface functional groups in a series of progressively oxidized graphite oxides. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 11, p. 2740-2749, 2006.
- 25 DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 228-240, 2010.
- 26 DIKIN, D. A.; STANKOVICH, S.; ZIMNEY, E. J.; PINER, R. D.; DOMMETT, G. H. B.; EVMENENKO, G.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Preparation and characterization of graphene oxide paper. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 457-460, 2007.
- 27 SI, Y.; SAMULSKI, E. T. Synthesis of water soluble graphene. **Nano Letters**, v. 8, n. 6, p. 1679-1682, 2008.
- 28 PAREDES, J. I.; VILLAR-RODIL, S.; MARTINEZ-ALONSO, A.; TASCON, J. M. D. Graphene oxide dispersions in organic solvents. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 10560-10564, 2008.
- 29 LIANG, Y. Y.; WU, D. Q.; FENG, X. L.; MULLEN, K. Dispersion of graphene sheets in organic solvent supported by ionic interactions. **Advanced Materials**, v. 21, n. 17, p. 1679-+, 2009.
- 30 PARK, M. J.; LEE, J. K.; LEE, B. S.; LEE, Y. W.; CHOI, I. S.; LEE, S. G. Covalent modification of multiwalled carbon nanotubes with imidazolium-based ionic liquids: Effect of anions on solubility. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 6, p. 1546-1551, 2006.
- 31 LIU, A. R.; HUANG, S. M. A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized onto platinum nanoparticles modified graphene electrode. **Science China-Physics Mechanics & Astronomy**, v. 55, n. 7, p. 1163-1167, 2012.
- 32 CINCOTTO, F. H.; GOLINELLI, D. L. C.; MACHADO, S. A. S.; MORAES, F. C. Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide modified with palladium nanoparticles for determination of desipramine in urine samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 488-493, 2017.

- 33 CINCOTTO, F. H.; CANEVARI, T. C.; CAMPOS, A. M.; LANDERS, R.; MACHADO, S. A. S. Simultaneous determination of epinephrine and dopamine by electrochemical reduction on the hybrid material $\text{SiO}_2/\text{graphene oxide}$ decorated with Ag nanoparticles. **Analyt.**, v. 139, n. 18, p. 4634-4640, 2014.
- 34 RABTI, A.; MAYORGA-MARTINEZ, C. C.; BAPTISTA-PIRES, L.; RAOUAFI, N.; MERKOCI, A. Ferrocene-functionalized graphene electrode for biosensing applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 926, p. 28-35, 2016.
- 35 GU, Z. G.; YANG, S. P.; LI, Z. J.; SUN, X. L.; WANG, G. L.; FANG, Y. J.; LIU, J. K. An ultrasensitive electrochemical biosensor for glucose using CdTe-Cds core-shell quantum dot as ultrafast electron transfer relay between graphene-gold nanocomposite and gold nanoparticle. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 25, p. 9162-9167, 2011.
- 36 ALGAR, W. R.; TAVARES, A. J.; KRULL, U. J. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 1, p. 1-25, 2010.
- 37 MICHALET, X.; PINAUD, F. F.; BENTOLILA, L. A.; TSAY, J. M.; DOOSE, S.; LI, J. J.; SUNDARESAN, G.; WU, A. M.; GAMBHIR, S. S.; WEISS, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 538-544, 2005.
- 38 REED, M. A. Quantum dots. **Scientific American**, v. 268, n. 1, p. 118-123, 1993.
- 39 ASRYAN, L. V.; WU, Y. C.; SURIS, R. A. Carrier capture delay and modulation bandwidth in an edge-emitting quantum dot laser. **Applied Physics Letters**, v. 98, n. 13, 2011.
- 40 CHON, B.; BANG, J.; PARK, J.; JEONG, C.; CHOI, J. H.; LEE, J. B.; JOO, T.; KIM, S. Unique temperature dependence and blinking behavior of CdTe/CdSe (core/shell) type-II quantum dots. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 2, p. 436-442, 2011.
- 41 KIM, S.; PARK, J.; KIM, T.; JANG, E.; JUN, S.; JANG, H.; KIM, B.; KIM, S. W. Reverse type-I ZnSe/InP/ZnS core/shell/shell nanocrystals: Cadmium-free quantum dots for visible luminescence. **Small**, v. 7, n. 1, p. 70-73, 2011.
- 42 LI, C. L.; SU, Y.; LV, X. Y.; XIA, H. L.; WANG, Y. J. Electrochemical acetylene sensor based on Au/MWCNTs. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 149, n. 2, p. 427-431, 2010.
- 43 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-&, 1962.
- 44 UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. Enzyme electrode. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 986-&, 1967.

- 45 ABRAHAM, S.; NIRALA, N. R.; PANDEY, S.; SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, S.; WALKENFORT, B.; SRIVASTAVA, A. Functional graphene-gold nanoparticle hybrid system for enhanced electrochemical biosensing of free cholesterol. **Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 3993-4002, 2015.
- 46 BOUJAKHROUT, A.; JIMENEZ-FALCAO, S.; MARTINEZ-RUIZ, P.; SANCHEZ, A.; DIEZ, P.; PINGARRON, J. M.; VILLALONGA, R. Novel reduced graphene oxide-glycol chitosan nanohybrid for the assembly of an amperometric enzyme biosensor for phenols. **Analyst**, v. 141, n. 13, p. 4162-4169, 2016.
- 47 LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment - (iupac technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.
- 48 SUMPTER, J. P.; JOHNSON, A. C. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 12, p. 4321-4332, 2005.
- 49 HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JUNIOR., G. A.; CAIRNS JUNIOR., J. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: CRC, 2003. cap. 39.
- 50 UOL. **Estudo acha hormônio sexual em água na região de Campinas**. 2010. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u129198.shtml> >. Acesso em: 01 fev. 2016.
- 51 GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Endocrine disruptors in the environment. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.
- 52 COPPE UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Teor de hormônio encontrado foi suficiente para gerar distúrbios no sistema endócrino de seres humanos e provocar a feminilização em uma população de peixes**. 2010. Disponível em: < <http://www.planeta.coppe.ufrj.br/artigo.php?artigo=1104> >. Acesso em: 10 fev. 2016.
- 53 BERONIUS, A.; RUDEN, C.; HANBERG, A.; HAKANSSON, H. Health risk assessment procedures for endocrine disrupting compounds within different regulatory frameworks in the european union. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 111-122, 2009.
- 54 KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNERCRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the us epa-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 715-740, 1996.

- 55 GUILLETTE, L. J.; GROSS, T. S.; MASSON, G. R.; MATTER, J. M.; PERCIVAL, H. F.; WOODWARD, A. R. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex-hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 8, p. 680-688, 1994.
- 56 KOMORI, K.; TANAKA, H.; OKAYASU, Y.; YASOJIMA, M.; SATO, C. Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in japan. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 93-100, 2004.
- 57 MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the atibaia river, sao paulo state (brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452-1462, 2011.
- 58 SODRE, F. F.; PESCARA, I. C.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 92-98, 2010.
- 59 KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; DE ALDA, M. J. L.; NETO, F. R. A.; BARCELO, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from rio de janeiro (brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2009.
- 60 NOVAKOVA, L.; SOLICH, P.; MATYSOVA, L.; SICHA, J. Hplc determination of estradiol, its degradation product, and preservatives in new topical formulation estrogen hbf. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 5-6, p. 781-787, 2004.
- 61 HAVLIKOVA, L.; NOVAKOVA, L.; MATYSOVA, L.; SICHA, J.; SOLICH, P. Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1-2, p. 216-223, 2006.
- 62 WATABE, Y.; KUBO, T.; NISHIKAWA, T.; FUJITA, T.; KAYA, K.; HOSOYA, K. Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17 beta-estradiol in river water. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1-2, p. 252-259, 2006.
- 63 WANG, S. H.; ZHUANG, H. S.; DU, L. Y.; LIN, S. L.; WANG, C. T. Determination of estradiol by biotin-avidin-amplified electrochemical enzyme immunoassay. **Analytical Letters**, v. 40, n. 5, p. 887-896, 2007.
- 64 ZHENG, Z. X.; DU, Y. L.; WANG, Z. H.; FENG, Q. L.; WANG, C. M. Pt/graphene-cnts nanocomposite based electrochemical sensors for the determination of endocrine disruptor bisphenol a in thermal printing papers. **Analyst**, v. 138, n. 2, p. 693-701, 2013.
- 65 WEN, T. T.; XUE, C.; LI, Y.; WANG, Y.; WANG, R. Y.; HONG, J. L.; ZHOU, X. M.; JIANG, H. J. Reduced graphene oxide-platinum nanoparticles composites based imprinting sensor for sensitively electrochemical analysis of 17 beta-estradiol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 682, p. 121-127, 2012.

- 66 MORAES, F. C.; ROSSI, B.; DONATONI, M. C.; DE OLIVEIRA, K. T.; PEREIRA, E. C. Sensitive determination of 17 beta-estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 881, p. 37-43, 2015.
- 67 HU, L. T.; CHENG, Q.; CHEN, D. C.; MA, M.; WU, K. B. Liquid-phase exfoliated graphene as highly-sensitive sensor for simultaneous determination of endocrine disruptors: Diethylstilbestrol and estradiol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 157-163, 2015.
- 68 DOISY, E. A.; CURTIS, J. M.; LEVIN, L.; KATZMAN, P. A.; THAYER, S. A. Some physiological properties of a new tri-atomic alcohol from the urine of pregnant women. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 28, n. 3, p. 216-217, 1930.
- 69 FIESER, L. F.; FIESER, M.; HERSHBERG, E. B.; HOLMES, H. L.; NEWMAN, M. S. Synthesis of substances of possible physiological activity. **Science**, v. 83, p. 558-558, 1936.
- 70 GAN, P.; COMPTON, R. G.; FOORD, J. S. The voltammetry and electroanalysis of some estrogenic compounds at modified diamond electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2423-2434, 2013.
- 71 CHEN, T. S.; HUANG, K. L. Effect of operating parameters on electrochemical degradation of estriol (e3). **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 5, p. 6343-6353, 2013.
- 72 LISBOA, N. S.; FAHNING, C. S.; COTRIM, G.; DOS ANJOS, J. P.; DE ANDRADE, J. B.; HATJE, V.; DA ROCHA, G. O. A simple and sensitive uflc-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters. **Talanta**, v. 117, p. 168-175, 2013.
- 73 STUDZINSKA, S.; BUSZEWSKI, B. Fast method for the resolution and determination of sex steroids in urine. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 927, p. 158-163, 2013.
- 74 WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G. Z.; HE, J. X.; ZHANG, Y. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 194-201, 2008.
- 75 TANG, Y. P.; ZHAO, S. Q.; WU, Y. S.; ZHOU, J. W.; LI, M. A direct competitive inhibition time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of unconjugated estriol in serum of pregnant women. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 4068-4073, 2013.
- 76 LI, Z. L.; WANG, S.; LEE, N. A.; ALLAN, R. D.; KENNEDY, I. R. Development of a solid-phase extraction - enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, n. 2, p. 171-177, 2004.

77 WANG, S. H.; LIN, S. L.; DU, L. Y.; ZHUANG, H. S. Electrochemical enzyme-linked immunoassay for the determination of estriol using methyl red as substrate. **Analytical Letters**, v. 39, n. 5, p. 947-956, 2006.

78 FONSECA, A. P.; LIMA, D. L. D.; ESTEVES, V. I. Degradation by solar radiation of estrogenic hormones monitored by uv-visible spectroscopy and capillary electrophoresis. **Water Air and Soil Pollution**, v. 215, n. 1-4, p. 441-447, 2011.

79 FLOR, S.; LUCANGIOLI, S.; CONTIN, M.; TRIPODI, V. Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 19, p. 3305-3313, 2010.

80 SANTOS, K. D.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1999-2006, 2010.

81 LIN, X. Q.; LI, Y. X. A sensitive determination of estrogens with a pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 2, p. 253-259, 2006.

82 ZHU, Y. Q.; LIU, X. J.; JIA, J. B. Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode. **Analytical Methods**, v. 7, n. 20, p. 8626-8631, 2015.

83 TIAN, M. M.; FENG, W.; YE, J. J.; JIA, Q. Preparation of fe₃o₄@tio₂/graphene oxide magnetic microspheres for microchip-based preconcentration of estrogens in milk and milk powder samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3984-3991, 2013.

84 LUO, L. Q.; LI, F.; ZHU, L. M.; DING, Y. P.; DENG, D. M. Electrochemical sensing platform of natural estrogens based on the poly(l-proline)-ordered mesoporous carbon composite modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 187, p. 78-83, 2013.

85 YU, W. W.; QU, L. H.; GUO, W. Z.; PENG, X. G. Experimental determination of the extinction coefficient of cdte, cdse, and cds nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 14, p. 2854-2860, 2003.

86 CINCOTTO, F. H.; MORAES, F. C.; MACHADO, S. A. S. Graphene nanosheets and quantum dots: A smart material for electrochemical applications. **Chemistry-a European Journal**, v. 20, n. 16, p. 4746-4753, 2014.

87 SU, X. Q.; WANG, G.; LI, W. L.; BAI, J. B.; WANG, H. A simple method for preparing graphene nano-sheets at low temperature. **Advanced Powder Technology**, v. 24, n. 1, p. 317-323, 2013.

- 88 ZHOU, J. H.; SUI, Z. J.; ZHU, J.; LI, P.; DE, C.; DAI, Y. C.; YUAN, W. K. Characterization of surface oxygen complexes on carbon nanofibers by tpd, xps and ft-ir. **Carbon**, v. 45, n. 4, p. 785-796, 2007.
- 89 KIM, J. H.; SONG, M. J.; LEE, C. J.; LEE, J. H.; KIM, J. H.; MIN, N. K. A comparative study of electrochemical and biointerfacial properties of acid- and plasma-treated single-walled carbon-nanotube-film electrode systems for use in biosensors. **Carbon**, v. 52, p. 398-407, 2013.
- 90 YUAN, L. H.; ZHANG, J.; ZHOU, P.; CHEN, J. X.; WANG, R. Y.; WEN, T. T.; LI, Y.; ZHOU, X. M.; JIANG, H. J. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted membranes at platinum nanoparticles-modified electrode for determination of 17 beta-estradiol. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 29, n. 1, p. 29-33, 2011.
- 91 LIU, X. Q.; WONG, D. K. Y. Electrocatalytic detection of estradiol at a carbon nanotube vertical bar ni(cyclam) composite electrode fabricated based on a two-factorial design. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, n. 2, p. 184-191, 2007.
- 92 CHAISUWAN, N.; XU, H.; WU, G. Y.; LIU, J. S. A highly sensitive differential pulse anodic stripping voltammetry for determination of 17 beta-estradiol (e2) using cdse quantum dots based on indirect competitive immunoassay. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 46, p. 150-154, 2013.
- 93 PHAM, H. T. M.; KUNATH, K.; GEHRMANN, L.; GIERBERG, M.; TUERK, J.; UHLIG, S.; HANKE, G.; SIMON, K.; BARONIAN, K.; KUNZE, G. Application of modified arxula adenivorans yeast cells in an online biosensor for the detection of estrogenic compounds in wastewater samples. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 185, p. 628-637, 2013.
- 94 POVEDANO, E.; CINCOTTO, F. H.; PARRADO, C.; DÍEZ, P.; SÁNCHEZ, A.; CANEVARI, T. C.; MACHADO, S. A. S.; PINGARRÓN, J. M.; VILLALONGA, R. Decoration of reduced graphene oxide with rhodium nanoparticles for the design of a sensitive electrochemical enzyme biosensor for 17 β -estradiol. **Biosensors and Bioelectronics**,
- 95 KARAHAN, S.; ZAHMAKIRAN, M.; OZKAR, S. A facile one-step synthesis of polymer supported rhodium nanoparticles in organic medium and their catalytic performance in the dehydrogenation of ammonia-borane. **Chemical Communications**, v. 48, n. 8, p. 1180-1182, 2012.
- 96 ARAQUE, E.; VILLALONGA, R.; GAMELLA, M.; MARTINEZ-RUIZ, P.; REVIEJO, J.; PINGARRON, J. M. Crumpled reduced graphene oxide-polyamidoamine dendrimer hybrid nanoparticles for the preparation of an electrochemical biosensor. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 17, p. 2289-2296, 2013.

- 97 SIAMAKI, A. R.; KHDER, A. E. S.; ABDELSAYED, V.; EL-SHALL, M. S.; GUPTON, B. F. Microwave-assisted synthesis of palladium nanoparticles supported on graphene: A highly active and recyclable catalyst for carbon-carbon cross-coupling reactions. **Journal of Catalysis**, v. 279, n. 1, p. 1-11, 2011.

- 98 SUBRAHMANYAM, K. S.; MANNA, A. K.; PATI, S. K.; RAO, C. N. R. A study of graphene decorated with metal nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 497, n. 1-3, p. 70-75, 2010.

- 99 BOUJAKHROUT, A.; SANCHEZ, A.; DIEZ, P.; JIMENEZ-FALCAO, S.; MARTINEZ-RUIZ, P.; PENA-ALVAREZ, M.; PINGARRON, J. M.; VILLALONGA, R. Decorating graphene oxide/nanogold with dextran-based polymer brushes for the construction of ultrasensitive electrochemical enzyme biosensors. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 17, p. 3518-3524, 2015.

- 100 MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v. 37, n. 5, p. 790+, 2004.

- 101 YE, J. T.; HOU, Y. J.; CHENG, L.; WANG, Y. Z.; YANG, L.; WANG, C. K. Water proof and strength retention properties of thermoplastic starch based biocomposites modified with glutaraldehyde. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 135-144, 2015.

- 102 ZHANG, X.; SUN, P. C.; HUANGSHAN, L. Z.; HU, B. H.; MESSERSMITH, P. B. Improved method for synthesis of cysteine modified hyaluronic acid for in situ hydrogel formation. **Chemical Communications**, v. 51, n. 47, p. 9662-9665, 2015.

- 103 DOS SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; SANCHEZ, A.; VILLALONGA, R.; GONCALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of calb properties during its immobilization. **Rsc Advances**, v. 5, n. 45, p. 35801-35810, 2015.

- 104 WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 425-430, 1994.

- 105 MCCREERY, R. L. Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2646-2687, 2008.

- 106 LIU, A. H.; ANZAI, J. I. A poly(4-vinylpyridine) derivative bearing os(5,6-dmphen)(2)cl (5,6-dmphen=5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline): A novel electrochemical indicator for detecting DNA hybridization. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 24, n. 4, p. 503-505, 2004.

- 107 KURNIAWATI, S.; NICELL, J. A. Characterization of trametes versicolor laccase for the transformation of aqueous phenol. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7825-7834, 2008.

- 108 GOMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNANDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 22-27, 2006.

- 109 VILLALONGA, M. L.; DIEZ, P.; SANCHEZ, A.; GAMELLA, M.; PINGARRON, J. M.; VILLALONGA, R. Neoglycoenzymes. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 9, p. 4868-4917, 2014.

- 110 LIN, Z. Y.; CHEN, L. F.; ZHANG, G. Y.; LIU, Q. D.; QIU, B.; CAI, Z. W.; CHEN, G. N. Label-free aptamer-based electrochemical impedance biosensor for 17 beta-estradiol. **Analyst**, v. 137, n. 4, p. 819-822, 2012.

- 111 KIM, B. K.; LI, J.; IM, J. E.; AHN, K. S.; PARK, T. S.; CHO, S. I.; KIM, Y. R.; LEE, W. Y. Impedometric estrogen biosensor based on estrogen receptor alpha-immobilized gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 671, p. 106-111, 2012.

- 112 HUANG, K. J.; LIU, Y. J.; ZHANG, J. Z. Aptamer-based electrochemical assay of 17 beta-estradiol using a glassy carbon electrode modified with copper sulfide nanosheets and gold nanoparticles, and applying enzyme-based signal amplification. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 1-2, p. 409-417, 2015.

- 113 KE, H. Y.; LIU, M. C.; ZHUANG, L.; LI, Z. X.; FAN, L. F.; ZHAO, G. H. A femtomolar level 17 beta-estradiol electrochemical aptasensor constructed on hierarchical dendritic gold modified boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 137, p. 146-153, 2014.

- 114 LI, J.; LIU, S.; YU, J. H.; LIAN, W. J.; CUI, M.; XU, W.; HUANG, J. D. Electrochemical immunosensor based on graphene-polyaniline composites and carboxylated graphene oxide for estradiol detection. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 188, p. 99-105, 2013.

- 115 HUANG, K. J.; LIU, Y. J.; LI, J.; GAN, T.; LIU, Y. M. Ultra-trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using solid-phase extraction coupled with hplc based on graphene-functionalized silica gel composites. **Analytical Methods**, v. 6, n. 1, p. 194-201, 2014.

- 116 PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 637-648, 2001.

- 117 ZOU, Y.; LI, Y. H.; JIN, H.; TANG, H. N.; ZOU, D. Q.; LIU, M. S.; YANG, Y. L. 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, p. 378-384, 2012.
- 118 VIKKISK, M.; KRUUSENBERG, I.; JOOST, U.; SHULGA, E.; KINK, I.; TAMMEVESKI, K. Electrocatalytic oxygen reduction on nitrogen-doped graphene in alkaline media. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 147, p. 369-376, 2014.
- 119 CESARINO, I.; CINCOTTO, F. H.; MACHADO, S. A. S. A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 210, p. 453-459, 2015.
- 120 MORAES, F. C.; CESARINO, I.; CESARINO, V.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles: A novel material for electrochemical sensing. **Electrochimica Acta**, v. 85, p. 560-565, 2012.
- 121 CESARINO, I.; CESARINO, V.; LANZA, M. R. V. Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 188, p. 1293-1299, 2013.
- 122 JIN, G. P.; LIN, X. Q. Voltammetric behavior and determination of estrogens at carbamylcholine modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 16-17, p. 3556-3562, 2005.
- 123 HURWITZ, A. R.; LIU, S. T. Determination of aqueous solubility and pka values of estrogens. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 5, p. 624-627, 1977.
- 124 KUSHWAHA, H. S.; SAO, R.; VAISH, R. Label free selective detection of estriol using graphene oxide-based fluorescence sensor. **Journal of Applied Physics**, v. 116, n. 3, 2014.
- 125 CINCOTTO, F. H.; CANEVARI, T. C.; MACHADO, S. A. S.; SANCHEZ, A.; BARRIO, M. A. R.; VILLALONGA, R.; PINGARRON, J. M. Reduced graphene oxide-sb₂o₅ hybrid nanomaterial for the design of a laccase-based amperometric biosensor for estriol. **Electrochimica Acta**, v. 174, p. 332-339, 2015.
- 126 CANEVARI, T. C.; VINHAS, R. C. G.; LANDERS, R.; GUSHIKEM, Y. SiO₂/sno₂/sb₂o₅ microporous ceramic material for immobilization of meldola's blue: Application as an electrochemical sensor for nadh. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2402-2406, 2011.

- 127 SLADKEVICH, S.; GUN, J.; PRIKHODCHENKO, P. V.; GUTKIN, V.; MIKHAYLOV, A. A.; MEDVEDEV, A. G.; TRIPOL'SKAYA, T. A.; LEV, O. The formation of a peroxyantimonate thin film coating on graphene oxide (go) and the influence of the go on its transformation to antimony oxides and elemental antimony. **Carbon**, v. 50, n. 15, p. 5463-5471, 2012.

- 128 FAN, G. C.; HUANG, Z. Y.; CHAI, C. F.; LIAO, D. K. Synthesis of micro-sized Sb_2O_3 hierarchical structures by carbothermal reduction method. **Materials Letters**, v. 65, n. 8, p. 1141-1144, 2011.

- 129 CANEVARI, T. C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; LANDERS, R.; BENVENUTTI, E. V.; MACHADO, S. A. S. Sol-gel thin-film based mesoporous silica and carbon nanotubes for the determination of dopamine, uric acid and paracetamol in urine. **Talanta**, v. 116, p. 726-735, 2013.

- 130 KUNDU, S.; WANG, Y. M.; XIA, W.; MUHLER, M. Thermal stability and reducibility of oxygen-containing functional groups on multiwalled carbon nanotube surfaces: A quantitative high-resolution xps and tpd/tpx study. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 43, p. 16869-16878, 2008.

- 131 GUSHIKEM, Y.; ROSATTO, S. S. Metal oxide thin films grafted on silica gel surfaces: Recent advances on the analytical application of these materials. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 695-705, 2001.

- 132 RUOFF, R. S.; DING, W. Q.; PINER, R.; STANKOVICH, S. Remarkable mechanics of extremely thin graphite platelets. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 229, p. U1146-U1146, 2005.

- 133 DEMPSEY, E.; DIAMOND, D.; COLLIER, A. Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 2, p. 367-377, 2004.

- 134 COMMITTEE, A. M. Analytical methods committee. **Analyst**, v. 112, p. 119, 1987.

- 135 WANG, S. F.; TAN, Y. M.; ZHAO, D. M.; LIU, G. D. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe_3O_4 nanoparticles-chitosan nanocomposite. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1781-1787, 2008.