UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Letícia Jordão Marques de Oliveira

**Estratégias sustentáveis para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico de papel
reciclado para detecção do hormônio 17 α -estradiol**

**São Carlos
2020**

LETÍCIA JORDÃO MARQUES DE OLIVEIRA

**Estratégias sustentáveis para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico de papel
reciclado para detecção do hormônio 17 α -estradiol**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

**São Carlos
2020**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Emanuel Carrilho, pela orientação, incentivo, amizade, conselhos e apoio ao meu aprendizado e crescimento profissional. E é claro, por ser um líder excepcional.

A Dra. Livia Sgobbi, por ter sido fundamental para o desenvolvimento do projeto, compartilhando de bom grado seu conhecimento em eletroanalítica, sensores e biossensores.

Aos colegas do BioMicS, grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações, em especial a Amanda Hikari, Juliane Borba, Thiago Segato, Letícia Marques, Bruno Araujo, Vinicius Ferreira, Cleyton Makara e Ma Hui Ling, pelo convívio amistoso no laboratório e pelos *happy hours* que deixarão saudades.

A técnica Claudia Bernal, pela solicitude e simpatia.

Ao Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, por disponibilizar prontamente seu laboratório para o uso dos potenciostatos.

Ao Tiago Serafim, orientando do Dr. Sérgio Machado, por ser uma excelente companhia e um grande colega de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

A meus pais, Claudinei Marques de Oliveira e Sirlene Jordão, por me apoiarem quando decidi deixar Itapetininga em 2012 para seguir o meu sonho de iniciar os estudos na USP.

Ao meu irmão Leandro, por sempre acreditar em mim.

E por fim, a todos meus amigos e companheiros de jornada. Em especial aos moradores do Alojamento USP-São Carlos, parceiros de luta pelo apoio à permanência estudantil.

RESUMO

Diversos estudos relataram a presença de novos compostos em águas residuais e em ambientes aquáticos, denominados “poluentes emergentes”. Entre eles estão fármacos, hormônios, cosméticos, produtos de higiene pessoal, surfactantes, biocidas e outros contaminantes orgânicos. Hormônios em especial causam alerta, devido ao potencial de agirem como desreguladores endócrinos no ambiente. Como hormônios (naturais e sintéticos) são diariamente lançados na rede de esgoto e o tratamento deste não é suficiente para eliminar tais substâncias, se faz necessário a criação de uma metodologia analítica confiável e de baixo custo para quantificação destas espécies. Assim, para oferecer um método de análise rápida, este trabalho relata o desenvolvimento de um novo dispositivo eletroanalítico descartável baseado na transferência direta de grafite de um lápis comum, desenhando e pintando um sistema de três eletrodos, em uma folha de papel reciclado, capaz de detectar etinilestradiol (EE2) em meio aquoso. Para a fabricação do dispositivo, foi explorada a técnica de deposição de cera com impressora para criação de superfície hidrofóbica e então testados grafites de lápis para a incorporação de eletrodos sobre o papel reciclado pela técnica *hand drawing*. O desempenho do dispositivo foi avaliado por voltametria cíclica da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, obtendo um valor de ΔE_p de 0,6743 V e reprodutibilidade satisfatória. Já a detecção do hormônio EE2 foi realizada por voltametria de pulso diferencial, sendo primeiramente otimizados os parâmetros em célula eletroquímica do tipo béquer. Construiu-se uma curva analítica em carbono vítreo na faixa de concentração de 1 a 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9978$). Já para o dispositivo eletroquímico baseado em papel descartável a melhor curva analítica foi obtida na faixa de 100 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9868$). Diferentes nanomateriais de carbono foram investigados para modificar a superfície da área de trabalho do dispositivo buscando otimizar a transdução do sinal e alcançar maior sensibilidade na detecção, sendo eles: nanotubos de carbono (CNTs), óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO). O rGO foi sintetizado via ácido ascórbico, considerada uma síntese de rota “verde”. Acredita-se que o dispositivo, uma vez desenvolvido e aprimorado, auxiliará na análise de águas tratadas e não tratadas, possibilitando o monitoramento dos níveis dessa espécie que ainda não possui legislação específica no país.

Palavras-chave: sensor, eletrodo desenhado a lápis, dispositivo analítico em papel, papel reciclado, etinilestradiol.

ABSTRACT

Several studies have reported the presence of new compounds in wastewater and aquatic environments, called “emerging pollutants”. Among them are drugs, hormones, cosmetics, personal care products, surfactants, biocides, and other organic contaminants. Hormones cause alertness, due to the potential to act as endocrine disruptors in the environment. As hormones (natural and synthetic) are released into the sewage system on a daily basis and the treatment is not sufficient to eliminate such substances. It is necessary to create a reliable and low-cost analytical methodology for the quantification of these species. Thus, to offer a rapid analysis method, this work reports the development of a new disposable electroanalytical device based on direct transfer of graphite from a common pencil, by drawing and painting a three electrodes system, on a recycled paper sheet, capable of detecting ethinylestradiol (EE2) in aqueous medium. For the fabrication of the device, the technique of wax deposition with a printer for the creation of a hydrophobic surface was explored and then pencil was tested for the incorporation of electrodes on the recycled paper by the hand drawing technique. The performance of the device was evaluated by cyclic voltammetry of the redox probe $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ obtaining a ΔE_p value of 0.6743 V and satisfactory reproducibility. The detection of the hormone EE2 was performed by differential pulse voltammetry, and the parameters were first optimized in an electrochemical cell type beaker. A glassy carbon analytical curve was constructed in the concentration range from 1 to 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9978$). For the disposable Electrochemical Paper-based Device, the best analytical curve was obtained in the range of 100 to 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9868$). Different carbon nanomaterials have been investigated to modify the surface of the device's working area in order to optimize signal transduction and achieve greater detection sensitivity, namely: carbon nanotubes (CNTs), graphene oxide (GO), and reduced graphene oxide (rGO). RGO was synthesized via ascorbic acid, considered a “green” route synthesis. It is believed that the device, once developed and improved, will assist in the analysis of treated and untreated waters, enabling the monitoring of the levels of this species that does not yet have specific legislation in the country.

Key words: sensor, pencil drawn electrode, paper-based analytical device, recycled paper, ethinylestradiol.

LISTA DE ABREVIATURAS

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>).
POC	Dispositivo de ponto de atendimento (do inglês <i>point-of-care</i>).
μPAD	Microdispositivos analíticos de papel (do inglês <i>Microfluidic Paper-based Analytical Devices</i>).
EPAD	Dispositivos eletroquímicos baseados em papel (do inglês <i>Electrochemical PAper-based Devices</i>).
WE	Eletrodo de trabalho (do inglês <i>working electrode</i>).
RE	Eletrodo de referência (do inglês <i>reference electrode</i>).
CE	Contra-eletrodo (do inglês <i>counter electrode</i>).
E1	Estrona.
E2	17β-Estradiol.
EE2	17α-Estradiol.
Des	Desreguladores endócrinos.
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>).
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>).
Ag/AgCl	Eletrodo de prata/cloreto de prata.
DMF	Dimetilformamida.
VPD	Voltametria de Pulso diferencial.
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X.
LOD	Limite de detecção.
MEV	Microscopia eletrônica de varredura.
rGO	Óxido de grafeno reduzido (do inglês, <i>reduced graphene oxide</i>).
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>).
VC	Voltametria cíclica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do processo de leitura da resposta de um sensor colorimétrico microfluídico em papel, a partir de um aplicativo de celular que realiza processamento de imagem.	12
Figura 2. Estrutura básica da uma célula de detecção eletroquímica para dispositivos microfluídicos em papel. WE é o eletrodo de trabalho, RE o eletrodo de referência e CE o contra eletrodo.	13
Figura 3. Dispositivo eletroquímico microfluídico à base de papel para detecção de glicose sendo acoplado a um glicosímetro comercial TRUEtrack®.	13
Figura 4. Representação do processo de fabricação de eletrodos baseado em lápis em plataformas de papel. A: Sistema de dois eletrodos para detecção eletroquímica de glicose. O Lápis de grafite é usado como eletrodo de trabalho e tinta de prata (desenhada na face posterior) como referência e eletrodo auxiliar; B: Eletrodos desenhados no papel usando lápis e então presos por e um chip de eletroforese; C: Sistema de três eletrodos desenhados a lápis em papel filtro para detecção de dopamina.	15
Figura 5. Estrutura de um esteróide típico.	17
Figura 6. Estrutura química dos compostos 17 β - estradiol (E2) e 17 α -estradiol (EE2). O círculo tracejado evidencia o acetileno presente no hormônio sintético.	18
Figura 7. Dispositivo eletroquímico composto de 3 eletrodos baseado em papel reciclado tratada a cera. A: eletrodos impressos da DropSense (Metrohm) que serviram como inspiração de layout; B: desenho projetado no AutoCad; C: pintura manual; e D: identificação da composição de cada eletrodo.	24
Figura 8. EPAD posicionado em um conector para leitura dos sinais eletroquímicos em um potenciostato Autolab®. A: dispositivo seco e B: dispositivo com 50 μ L de solução depositada sobre a área eletródica.	27
Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para A) papel sulfite Office Paper Chamex; B) Papel Reciclado Eco Chamex; C) Papel reciclado impresso a cera com tratamento térmico em chapa aquecida a 120 °C por 2 min; D) Papel reciclado impresso a cera e com desenho de lápis de grafite; E) Papel reciclado impresso a cera e com tratamento térmico em estufa a 50 °C por 1 min. Amplificação de 1000 $\times$	29
Figura 10. Mapa composicional dos elementos químicos presentes na microscopia da Figura 4A: a) microscopia de ampliação 3.500 $\times$, com contraste em: b) carbono, c) oxigênio e, d) cálcio.	30
Figura 11. Imagens de gotas de água depositadas sobre a superfície do papel (no tempo 1 segundo) para cálculo do ângulo de contato. (A) Diagrama esquemático do cálculo do ângulo de contato, onde θ_1 representa o lado direito e θ_2 o lado esquerdo da gota. (B) A Amostra de papel reciclado e (C) papel reciclado após tratamento com cera.	31
Figura 12. Imagem do protótipo inicial do dispositivo após ser depositada uma gota de 50 μ L de corante sobre a área eletródica.	31
Figura 13. Comparação da resistência elétrica de trilhas lápis, de diferentes graduações, medidas em tiras de papel reciclado, hidrofobizadas com cera.	32
Figura 14. Comparação da resistência elétrica de diferentes papéis medidas em tiras desenhadas com lápis 8B.	33

Figura 15. Protótipo final dos EPAD baseados em papel reciclado.....	35
Figura 16. Voltamogramas cíclicos de três diferentes EPAD, gerados em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mmol L ⁻¹ em eletrólito de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , na velocidade de 50 mVs ⁻¹ , para investigação da reprodutibilidade.....	36
Figura 17. Voltamogramas cíclicos retratando a vida útil de um EPAD, gerados em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/4-$ na velocidade de 50 mVs ⁻¹ , para investigação da vida útil. A: ciclos de 1 a 150; B: microscopia eletrônica de varredura do EPAD após as 150 ciclagens; e C: voltamogramas dos ciclos 1, 50, 100 e 150.	37
Figura 18. Espectros de UV-Vis da solução de GO.	38
Figura 19. Espectros de UV-Vis da amostra de rGO reduzida via ácido L-ascórbico.	39
Figura 20. Espectros Raman da amostra de rGO reduzida via ácido L-ascórbico. Detalhe: Micrografia do material com escala de 90 μm.	40
Figura 21. Difratomogramas da amostra de rGO reduzida via ácido L-ascórbico.....	40
Figura 22. Imagem de TEM do rGO.	41
Figura 23. Voltamogramas cíclicos dos EPAD registrados em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mmol L ⁻¹ em KCl 1 mmol L ⁻¹ , em diferentes velocidades de varredura (10 a 50 mV/s), sendo o (A) sem modificação, (B) com adição de óxido de grafeno, (C) com adição de nanotubos, e (D) com adição de óxido de grafeno reduzido.	42
Figura 24. Voltamogramas cíclicos dos EPAD modificados com nanomateriais de carbono frente ao analito etinilestradiol com concentração de 0,5 μmol L ⁻¹ em tampão Britton-Robinson pH 7, gerados em velocidade de varredura de 50 mV/s.....	43
Figura 25. Voltamogramas de pulso diferencial de solução 100 μmol L ⁻¹ de etinilestradiol em tampão BR nos pH 4, 7 e 11, utilizando célula convencional de carbono vítreo.	44
Figura 26. Comparação entre o voltamograma de pulso diferencial na presença do tampão Britton-Robinson pH 7 e o tampão com adição de etanol, na proporção utilizada na diluição.	45
Figura 27. Voltamograma de pulso diferencial em carbono vítreo na presença de etinilestradiol, variando de 1 (a) a 8 (h) μmol L ⁻¹ em tampão BR pH 7,0.....	46
Figura 28. Curva analítica referente a detecção de etinilestradiol em carbono vítreo, na faixa de 1 a 8 μmol L ⁻¹ em tampão BR pH 7,0.....	46
Figura 29. Voltamograma de pulso diferencial no EPAD na presença de etinilestradiol, variando de 100 (a) a 500 (e) μmol L ⁻¹ em tampão BR pH 7,0.	47
Figura 30. Curva analítica referente a detecção de etinilestradiol em carbono vítreo, na faixa 100 a 500 μmol L ⁻¹ em tampão BR pH 7,0.....	48
Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial no EPAD modificado com rGO na presença de etinilestradiol, variando de 100 (a) a 500 (e) μmol L ⁻¹ em tampão BR pH 7,0.....	49
Figura 32. Curva analítica referente a detecção de etinilestradiol em EPAD modificado com rGO, na faixa 100 a 500 μmol L ⁻¹ em tampão BR pH 7,0.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição atômica determinada por EDS das minas de lápis B, 2B, 3B, 4B, 6B e 8B.....	32
Tabela 2. Valores de resistência para as trilhas condutoras desenhadas no papel reciclado hidrofobizado utilizando diferentes lápis.	33
Tabela 3. Composição atômica da superfície do eletrodo de referência (RE).....	34
Tabela 4. Comparação dos valores de ΔE_p de três diferentes EPAD.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO TEÓRICA FUNDAMENTAL	11
1.1	Microdispositivos analíticos de papel	11
1.2	Microdispositivos analíticos de papel aplicados a análise ambiental	15
1.3	Contaminantes emergentes	16
1.4	Estrogênios e o estradiol sintético (EE2)	17
1.5	Método de detecção atual do 17 α -estradiol (EE2)	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.1.1	Objetivos específicos	21
3	EXPERIMENTAL	22
3.1	Detecção do analito utilizando célula eletroquímica convencional	22
3.2	Confecção dos EPAD	22
3.3	Síntese do óxido de grafeno reduzido	24
3.4	Caracterização do óxido de grafeno reduzido	25
3.5	Caracterização física do dispositivo	25
3.5.1	Microscopia eletrônica de varredura- MEV	25
3.5.2	Ângulo de contato	25
3.5.3	Análises de Energia Dispersiva- EDS	26
3.5.4	Resistência de trilha condutora- RS	26
3.6	Caracterização eletroquímica do dispositivo	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Caracterização física do dispositivo	28
4.2	Caracterização eletroquímica do dispositivo	35
4.2.1	Investigação do desempenho eletroquímico dos eletrodos por voltametria cíclica	35
4.2.2	Voltametria de pulso diferencial	43
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO TEÓRICA FUNDAMENTAL

1.1 Microdispositivos analíticos de papel

A miniaturização de métodos analíticos já existentes na química é uma linha explorada para a produção de sensores químicos e biossensores desde o início dos anos 90, marcando a virada do século XXI na área da química analítica. Um sensor pode ser definido como um dispositivo analítico em miniatura (não um instrumento ou um aparelho) que responda à presença e/ou concentração (atividade) de uma espécie de analito. (PETRUKHIN; MAKSIMENKO, 2008) Os sensores químicos geralmente apresentam dois componentes básicos ligados em série: um sistema de reconhecimento químico ou molecular (receptor) e um transdutor de sinal. Já os biossensores, de acordo com a definição da IUPAC, contam com um elemento de reconhecimento biológico (enzima, anticorpo, aptâmero etc.) que está em contato direto com o elemento de transdução. (TURNER, 1989)

No início, o vidro foi o substrato dominante para a fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados (MANZ et al., 1992), seguidos por polímeros como poli(dimetilsiloxano) (PDMS). (MCDONALD; WHITESIDES, 2002) No entanto, com o decorrer dos anos o papel, material fibroso e de baixo custo, entrou em foco e vem sendo largamente estudado. A capilaridade, propriedade que faz com que os fluidos percorram facilmente as fibras do papel, permitiu a combinação de algumas das capacidades dos dispositivos microfluídicos convencionais com a simplicidade dos testes de diagnóstico em tira (*strip tests*). Martinez et al (2010) apresentou brilhantemente as possibilidades de diagnóstico no local de atendimento (POC, do inglês *point-of-care*) permitidas pelos microdispositivos analíticos de papel (μ PAD, do inglês *Microfluidic Paper-based Analytical Devices*), quando aliados a criatividade e conhecimento científico clássico. (MARTINEZ; PHILLIPS; WHITESIDES, 2010) Os μ PADs se estabeleceram como plataformas analíticas descartáveis e se destacam devido à leveza, flexibilidade, fácil descarte, baixo custo e possibilidade de conduzir ensaios no ponto de uso, podendo ser transportado em grandes quantidades para lugares remotos e de recursos limitados. (YANG et al., 2017)

Outra característica de destaque do papel é que ele permite ser escrito e impresso com precisão por diferentes materiais e processos, fato que possibilita que rotas de fabricação de microdispositivos baseados em papel sejam exploradas. (XIA; SI; LI, 2016) O papel mais popular usado na fabricação de sensores é o papel cromatográfico, Whatman no. 1. Este papel possui superfície lisa, uniformidade nos dois lados, rápida vazão dos fluidos e espessura de

0,18 mm, o que possibilita o processamento em impressoras comerciais. (NERY; KUBOTA, 2013) Contudo, nos casos em que o fluxo do fluido não é um fator crítico, e o papel executa primordialmente a função de suporte flexível para eletrodos ou biomoléculas, é mais usado e aconselhado o papel de escritório (sulfite), uma vez que a acessibilidade e o preço são favoráveis. (ATAIDE et al., 2020)

A técnica de detecção que primeiro se estabeleceu foi a detecção colorimétrica, em que a intensidade da cor é proporcional a concentração do analito. Todavia, o fato de a quantificação ocorrer por comparação visual pode implicar em diferença de percepção de cor de uma pessoa para outra. Sendo assim, instrumentos para leitura da cor foram explorados e até mesmo aplicativos de celular para processamento de imagens foram desenvolvidos. (ZHU et al., 2014) (MORBIOLI et al., 2017) A **Figura 1** apresenta um sensor colorimétrico microfluídico em papel combinado com um aplicativo de androide, para detecção de múltiplos analitos em amostra de água.

Figura 1. Representação do processo de leitura da resposta de um sensor colorimétrico microfluídico em papel, a partir de um aplicativo de celular que realiza processamento de imagem.

Fonte: Adaptado de LOPEZ-RUIZ et al., 2014.

A detecção colorimétrica a partir de câmeras de celular ou *scanners* de bancada para captura de imagens digitais apresenta maior confiabilidade nos resultados, mas ainda falha em sensibilidade e seletividade quando comparada ao uso de instrumentos analíticos tradicionais. (MARTINEZ et al., 2008) Detecção eletroquímica por outro lado é uma proposta promissora, uma vez que os limites de detecção são baixos, enquanto a sensibilidade e seletividade são altas. O custo apesar de ser superior ao da colorimétrica ainda é atrativo, além da instrumentação envolvida ser simples e de fácil operação. (NIE et al., 2010) Desde os estudos iniciais relatados por (DUNGCHAI; CHAILAPAKUL; HENRY, 2009), o

desenvolvimento de dispositivos analíticos eletroquímicos baseados em papel (EPADs) continuou a uma taxa exponencial e pode ser considerado um dos meios de detecção mais promissores para μ PADs no momento, tanto para plataformas POC quanto para sensores vestíveis.(SANTHIAGO et al., 2017) A **Figura 2** apresenta o design básico de um EPAD, composto por eletrodo de trabalho (WE), referência (RE) e contra-eletrodo (CE). A área hidrofílica é projetada para comportar o fluido a ser analisado, enquanto a área hidrofóbica ao redor previne que o analito esorra e protege o contato elétrico. O padrão de canais microfluídicos pode ser imposto por diferentes metodologias, como fotolitografia ou impressão a cera fazendo uso de impressora comercial.(CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009)

Figura 2. Estrutura básica da uma célula de detecção eletroquímica para dispositivos microfluídicos em papel. WE é o eletrodo de trabalho, RE o eletrodo de referência e CE o contra eletrodo.

Fonte: DUNGCHAI; CHAILAPAKUL; HENRY, 2009.

Eletrodos vêm sendo incorporados com sucesso sobre o substrato de papel. Para tal, basta aplicar um material condutor sobre o papel, direta ou indiretamente, por meio de técnicas já existentes na literatura, como *screen printing*, *sputtering*, *stencil-printing*, *injekting printing* e *hand drawing*. Embora simples, devido a liberdade em layout dos EPADs e a possibilidade imobilizar diferentes elementos na área eletródica, eles podem até mesmo ser adaptados a um leitor portátil comercial. A **Figura 3** ilustra um EPAD capaz de detectar glicose, conectado a um TRUEtrack®, um glicosímetro comercializado pela farmácia CVS. (NIE et al., 2010)

Figura 3. Dispositivo eletroquímico microfluídico à base de papel para detecção de glicose sendo acoplado a um glicosímetro comercial TRUEtrack®.

Fonte: Adaptado de NIE et al., 2010.

A utilização de materiais populares baseados em carbono como material condutor tem proporcionado avanços notórios na área, pois possibilita uma produção econômica de eletrodos que apresentam um desempenho similar ou melhor que as tradicionais alternativas que fazem uso de metal nobre. É intuitivo pensar no lápis como um representante popular de material derivado de carbono, e sua acessibilidade fez com que ele fosse investigado na área por diversos trabalhos.(DOSSI et al., 2013a) (DOSSI et al., 2013b) (DIAS et al., 2018) O lápis já foi utilizado como sendo o próprio eletrodo de trabalho, de forma externa ao EPAD, conforme abordagem ilustrada na **Figura 4A** (SANTHIAGO; KUBOTA, 2013), assim como também já produziu eletrodos exercendo sua função mais usual: desenhando; a **Figura 4B** traz a representação do desenho manual de eletrodos a lápis em uma plataforma de papel para detecção de condutividade sem contato, utilizando um chip de eletroforese (CHAGAS et al., 2015) , enquanto a **Figura 4C** exibe um sistema de três eletrodos inteiramente desenhados a lápis para detecção de dopamina. (LI et al., 2016)

Figura 4. Representação do processo de fabricação de eletrodos baseado em lápis em plataformas de papel. A: Sistema de dois eletrodos para detecção eletroquímica de glicose. O Lápis de grafite é usado como eletrodo de trabalho e tinta de prata (desenhada na face posterior) como referência e eletrodo auxiliar; B: Eletrodos desenhados no papel usando lápis e então presos por um chip de eletroforese; C: Sistema de três eletrodos desenhados a lápis em papel filtro para detecção de dopamina.

Fonte: A-Adaptado de SANTHIAGO; KUBOTA, 2013; B- Adaptado de (CHAGAS et al., 2015 e C- LI et al., 2016.

A técnica de desenho a mão direto (*hand drawing*) é um dos métodos mais criativos, claros e econômicos de se preparar um EPAD descartável em laboratório para o estudo da detecção de um processo redox. (ORZARI et al., 2018) Uma vantagem dessa técnica é uma vez que o grafite é transferido diretamente para o papel, não é necessário um aglutinante adicional e nenhum resíduo é produzido, como em *screen* e *stencil-printing*. Contudo, a reprodutibilidade e a robustez ainda são um desafio a ser vencido.

1.2 Microdispositivos analíticos de papel aplicados a análise ambiental.

Embora os μ PADs tenham sido originalmente desenvolvidos como ensaios biomédicos para diagnóstico no local de atendimento, seu uso se expandiu para a pesquisa ambiental. Em comparação com os progressos alcançados em dispositivos biomédicos, monitoramento ambiental com μ PADs ainda é um campo emergente de pesquisa. Os analitos para μ PADs ambientais podem ser agrupados aproximadamente em três classes: inorgânico (metais, não-metais), orgânico (pesticidas, hormônios etc.) e biológico (bactérias etc.). Um dos primeiros exemplos de quantificação de metais realizado em μ PAD era um sensor composto por quatro zonas para medir simultaneamente Fe, Cu e Ni a partir de cinzas de incineração médica, por meio de detecção colorimétrica. (MENTELE et al., 2012)

Até o momento, a maioria das pesquisas de cunho ambiental se concentraram no desenvolvimento e aplicação de μ PADs para segurança de comida, água e monitoramento

de qualidade; incluindo procedimentos de fabricação dos μ PADs e métodos adequados de detecção para interpretação qualitativa ou quantitativa das medições.(BUSA et al., 2016)

A exposição a poluentes orgânicos ambientalmente persistentes tem inúmeros efeitos adversos à saúde, dependendo do mecanismo de ação (por exemplo, xenoestrogênica, carcinogênica, mutagênica etc.) ou os órgãos impactados. A lista de poluentes persistentes é constantemente atualizada, visto que com o passar dos anos novas classes de compostos emergentes tornam-se prioridade.

1.3 Contaminantes emergentes

O meio ambiente é diariamente exposto a uma vasta gama de diversos produtos químicos sintéticos. Há pouco mais de 40 anos, os estudos sobre a vida silvestre sugeriam que as substâncias químicas inseridas no meio ambiente poderiam estar interagindo com sistemas hormonais, uma hipótese que desde então tem sido consolidada e debatida tanto na imprensa popular quanto na literatura científica. Preocupações sobre a toxicidade endócrina mediada pelo ambiente também chamaram a atenção de muitas organizações de saúde internacionais, bem como de grupos de pressão, como o Greenpeace e o World Wildlife Fund (Reino Unido). Reconhecendo a possibilidade de uma ameaça em ascensão para a saúde pública, a Comissão Europeia identificou as substâncias denominadas contaminantes emergentes (CE) como uma importante questão de saúde pública e está incentivando uma série de iniciativas de investigação. Uma ampla gama de contaminantes orgânicos e inorgânicos já é controlada pela legislação descrita pela Comissão Europeia (Comissão Europeia, 2008), sendo eles em maioria produtos químicos industriais ou agrícolas. Contudo, espera-se que em breve a legislação aumente para englobar um número maior de compostos, seguindo a proposta dos medicamentos 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e diclofenaco como substâncias perigosas prioritárias da água (Comissão Europeia, 2012). As metas legislativas propostas foram rigorosas, sendo 0,4, 0,035 e 100 ng L⁻¹ para E2, EE2 e diclofenaco, respectivamente (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015)

Embora em concentração traço no ambiente (ng L⁻¹ ou μ g L⁻¹), esses microcontaminantes afetam tanto o ecossistema quanto a saúde e a qualidade de vida dos seres humanos, uma vez que agem como desreguladores endócrinos (DEs). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2010), os desreguladores endócrinos podem ser definidos como: “agentes exógenos, que mesmo em concentrações-traço, possuem a capacidade de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou

eliminação de hormônios naturais, responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e comportamento dos organismos”. Estudos comprovam a presença de hormônios sintéticos contidos na formulação de anticoncepcionais, como o etinilestradiol, em água do descarte no Brasil e já são estudadas técnicas de remoção. (LIMA et al., 2017) (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010)

Os efeitos na saúde provocados por DEs incluem disfunções do sistema reprodutor, como fertilidade reduzida, alterações na razão machos/fêmeas, perda de fetos, alterações no ciclo menstrual, mudanças nos níveis hormonais e puberdade precoce. (ACERINI; HUGHES, 2006) Um estudo foi realizado para investigar os efeitos de exposição a concentrações ambientalmente realistas de um modelo de estrogênio (17 α -estradiol, EE2) e um efluente misto de esgoto doméstico e industrial no sucesso reprodutivo de um peixe marinho, e conclui-se que ocorre uma drástica redução na porcentagem de ovos férteis.(ROBINSON et al., 2003)

Entende-se que atualmente um dos maiores problemas analíticos a respeito dos DEs é a escassez de métodos e instrumentos para monitoramento contínuo e controle dessas substâncias na água de abastecimento.

1.4 Estrogênios e o estradiol sintético (EE2)

Estrogênio é uma categoria de hormônios esteróides que estão relacionados com o controle da ovulação, preparo do útero para reprodução e desenvolvimento de características femininas, sendo os principais: a estrona (E1), o estradiol (E2) e o estriol (E3). Os hormônios esteroides são sintetizados a partir do colesterol, tendo em comum uma estrutura constituída de três anéis hexagonais e um anel pentagonal (**Figura 5**).

Figura 5. Estrutura de um esteróide típico.

Fonte: Autoria própria.

Os estrogênios podem ser classificados também quanto a sua origem, sendo chamados

de naturais aqueles cuja fonte é o organismo humano, e sintéticos aqueles produzido por meio de um processo artificial, controlado em laboratório. Existem ainda os bioidênticos, hormônios com estruturas moleculares idênticas às encontradas no organismo humano, podendo ser de origem sintética ou natural. O estradiol natural, chamado 17 β - estradiol (E2), é produzido pelos ovários na fase pré ovulatória. O controle de níveis de estradiol no corpo humano pode ser utilizado para monitoramento, como: detectar enfermidades do ovário, menopausa precoce, infertilidade, e menstruação irregular. Já o etinilestradiol (EE2), também chamado 17 α -estradiol, é um derivado sintético do estradiol e é um dos componentes mais recorrentes na formulação dos anticoncepcionais prescritos para as mulheres no mundo. A fórmula molecular do EE2 é C₂₀H₂₄O₂, bastante semelhante ao hormônio natural, contando com 3 anéis de 6 carbonos (sendo um deles aromático e ligado a uma hidroxila, se caracterizando como um anel fenólico) e um anel de 5 carbonos. As estruturas de ambos podem ser observadas na **Figura 6**, evidenciado que são diferenciados apenas pela presença de um radical acetileno no hormônio sintético.

Figura 6. Estrutura química dos compostos 17 β - estradiol (E2) e 17 α -estradiol (EE2). O círculo tracejado evidencia o acetileno presente no hormônio sintético.

Fonte: Autoria própria.

Tanto o E2 produzido pelo corpo humano, quanto o EE2 metabolizado pelo usuário do fármaco são liberados via fezes e urina, se juntando ao efluente doméstico. Além do esgoto residencial, o EE2 tem a entrada potencializada no ambiente por meio dos despejos da indústria farmacêutica. Uma vez no ambiente, esses resíduos integram a classe de poluentes emergentes descrita como DEs. Há ausência de correlação entre a concentração de estrogênios e os parâmetros controlados pela legislação para águas naturais, expressos na Resolução Conama 357/05, evidenciando que o enquadramento legal no Brasil não oferece

segurança quanto a este grupo de contaminantes.(LOPES et al., 2010)

1.5 Método de detecção atual do 17 α -estradiol (EE2)

Devido à sua baixa concentração em água de descarte, na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou mesmo ng L^{-1} , métodos tradicionais de detecção desse analito incluem uma etapa prévia de pré-concentração, sendo a extração em fase sólida (SPE) a mais utilizada, seguida de separação por cromatografia líquida (DANIEL; DE LIMA, 2014) ou a gás (BROSSA et al., 2002), geralmente acoplada a detecção por espectrometria de massas. Esse tipo de análise requer equipamentos sofisticados, tempos de análise longos, profissionais capacitados e alto investimento. Sendo assim, o monitoramento constante do nível de estrogênios em águas a serem descartadas como efluentes se torna demorado e complicado quando feito por métodos convencionais.

Estudos recentes vêm investigando métodos eletroquímicos para o monitoramento desses compostos, uma vez que são técnicas que fornecem respostas rápidas com instrumentação de custo relativamente inferior.(MARTÍNEZ et al., 2012) (PAVINATTO et al., 2015) (NODEHI et al., 2020) A eletroquímica é reações envolvendo transferências eletrônicas, pois relaciona o fluxo de elétrons a transformações químicas. Fazendo uso de uma fonte externa de energia, como um potenciostato, pode-se aplicar uma voltagem a um eletrodo de trabalho para modular a energia dos seus elétrons. O potenciostato é um dispositivo eletrônico capaz de controlar a diferença de potencial elétrico (ddp) entre o eletrodo de trabalho (WE) e o eletrodo de referência (RE). O equipamento mantém o potencial estável, monitorando a corrente elétrica (i) que circula através da célula entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, também chamado de contra eletrodo (CE). A variação de corrente elétrica (Δi) medida é um parâmetro útil para avaliarmos as propriedades da solução em estudo, podendo ser relacionada com a variação de potencial ou com a variação de tempo, conforme a técnica eletroquímica escolhida.(ELGRISHI et al., 2018) A amperometria é uma técnica utilizada na detecção de íons em solução e faz uso de dados da variação de corrente. Qualquer composto passível de ser oxidado ou reduzido pode ser considerado um candidato à detecção amperométrica.(PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002)

O EE2 é uma molécula que pode ser oxidada devido a presença do grupo hidroxila (OH) ligado ao anel aromático, logo, a detecção direta se destaca como uma boa alternativa para investigação da concentração deste composto em solução. A detecção direta é o tipo de

detecção mais simples em que o sinal eletroquímico medido vem do analito de interesse em vez de um marcador (*label*), produto ou mediador.

No entanto, os métodos eletroquímicos que fazem uso de células eletroquímicas convencionais, do tipo béquer, não são adequados para serem operados por pessoas não especializadas, bem como para realizar análises em campo. Desse modo, faz-se necessário o desenvolvimento de um dispositivo eletroquímico que supra a demanda por praticidade e aplicação no ponto de uso. Sendo assim, dado a crescente relevância dos microdispositivos analíticos de papel e seu potencial atrativo para análise de monitoramento e qualidade de água, o presente projeto visa desenvolver um dispositivo analítico eletroquímico de papel (EPAD) capaz de detectar etinilestradiol (EE2) em meio aquoso.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um sensor eletroquímico descartável e de baixo custo para detecção de etinilestradiol, explorando estratégias sustentáveis como o uso de papel reciclado como substrato e síntese verde de nanomaterial de carbono.

2.1.1 Objetivos específicos

1. Otimizar os parâmetros para detecção do analito utilizando célula eletroquímica convencional com eletrodo de carbono vítreo;
2. Desenvolver e caracterizar os microdispositivos de papel para detecção eletroquímica;
3. Estudar a modificação da área eletródica do dispositivo com nanomateriais de carbono;
4. Avaliar e otimizar a transdução eletroquímica do μ PAD fabricado frente à sonda redox ferrocianeto;
5. Avaliar o desempenho do dispositivo frente a detecção do analito 17 α -estradiol.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Detecção do analito utilizando célula eletroquímica convencional

Foi avaliado o comportamento eletroquímico de etinilestradiol (EE2) em célula eletroquímica convencional de três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho carbono vítreo, um de referência prata Ag/AgCl e um auxiliar de platina. Inicialmente foi realizada uma etapa de limpeza e condicionamento do carbono vítreo, que consistiu em polimento do eletrodo em suspensão de alumina 0,5 μm , seguido de banho ultrassônico em etanol por cinco minutos e em água Milli Q por mais cinco minutos. O eletrodo de carbono vítreo polido e limpo foi imerso em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} para realização de um pré-tratamento, que consistiu em cronoamperometria durante 30 s em potencial de -2 V , seguida de 20 voltamogramas cíclicos entre os potenciais de 0 e 1 V vs. Ag/AgCl. A etapa seguinte consistiu em modificar a superfície eletródica com nanomateriais derivados de carbono, com intuito de avaliar o desempenho eletrocatalítico destes em relação à oxidação dos analitos de interesse. Para a modificação, 6 μL de suspensão foram gotejadas sobre a área de trabalho ($\varnothing 3\text{ mm}$). Foram investigados os materiais: nanotubos de carbono suspenso em Dimetilformamida-DMF Sigma-Aldrich; óxido de grafeno suspenso em água; e óxido de grafeno reduzido sintetizado via redução com ácido L-ascórbico (rota verde). A investigação do comportamento eletroquímico da oxidação do hormônio se deu por voltametria de pulso diferencial (VPD). A solução estoque de etinilestradiol 1 mmol L^{-1} foi preparada a partir do padrão Sigma Aldrich e álcool etílico Synth. O eletrólito suporte foi o tampão Britton Robinson 0,04 mol L^{-1} pH 7. Para construção da curva analítica foi necessário limpeza do eletrodo a cada nova concentração, a limpeza consistiu em 50 voltamogramas cíclicos entre os potenciais de 0 e 1 V vs. Ag/AgCl, em imersão de tampão Britton Robinson 0,04 mol L^{-1} pH 7.

3.2 Confeção dos EPAD

O substrato (papel) recebeu impressão a cera utilizando a impressora de cera Xerox Color Qube 8570 para criação de uma barreira hidrofóbica.(CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009) Após a impressão, as folhas foram submetidas a um tratamento térmico em chapa de aquecimento a 120°C por 2 min. Sobre a cera, pintou-se manualmente trilhas condutoras utilizando lápis de grafite como material condutor. Nesse processo foram testados os papeis: cromatográfico Whatman nº1, sulfite Office Paper Chamex e sulfite

reciclado Eco Chamex. Para o lápis de grafite escolheu-se a marca Faber Castell (fábrica localizada em São Carlos) e testou-se as graduações B, 2B, 3B, 4B, 6B e 8B. Após pintado com o lápis de grafite, aplicou-se fita dupla face 3M® no verso e o layout desejado foi delineado fazendo uso de uma cortadora a laser. O desenho foi projetado no software AutoCAD, inspirado nos eletrodos impressos da DropSense (Metrohm). Nessa adaptação os contatos elétricos possuem 1.5 mm de largura e 1.25 mm de espaçamento entre eles, sendo este o valor exato para encaixar em um adaptador de baixo custo. Além disso, o círculo desenhado para o eletrodo central possui diâmetro de 3 mm, assim como o eletrodo de carbono vítreo, para equiparar a área de trabalho nos estudos de comparação.

O eletrodo de referência Ag/AgCl foi produzido por reação entre o traço com caneta de prata MG Chemicals® e 30 µL de solução de hipoclorito de sódio aquoso comercial. Deixou-se reagir por 10 min, conforme a reação (1) ilustrada abaixo:

Após os 10 min. estipulados, a gota de hipoclorito de sódio foi removida com o auxílio de lenço de papel (por capilaridade). A área foi lavada com água destilada três vezes (depositada com micropipeta) e seca com um jato de N₂ (g). Com essa reação foi possível formar uma camada de AgCl na superfície do eletrodo, devido à baixa solubilidade do AgCl. A **Figura 7** apresenta uma imagem do processo de fabricação do dispositivo, logo após os três eletrodos serem devidamente estabelecidos sobre o substrato de papel.

Figura 7. Dispositivo eletroquímico composto de 3 eletrodos baseado em papel reciclado tratada a cera. A: eletrodos impressos da DropSense (Metrohm) que serviram como inspiração de layout; B: desenho projetado no AutoCad; C: pintura manual; e D: identificação da composição de cada eletrodo.

Fonte: Autoria própria.

Após finalizado o dispositivo, para garantir que a solução do analito não escorresse para os contatos elétricos durante o uso, foi utilizado um pedaço de fita isolante Scotch® 3M. Para os dispositivos modificados com nanomateriais, depositou-se 6 μL da suspensão na área de trabalho ($\varnothing$ 3 mm) com o auxílio de uma micropipeta, pingando-se de 2 em 2 μL . Os dispositivos modificados foram deixados secar em temperatura ambiente dentro de dessecador.

3.3 Síntese do óxido de grafeno reduzido

O óxido de grafeno reduzido foi sintetizado via ácido L-ascórbico a partir do óxido de grafeno Sigma Aldrich. O método foi adaptado de ZHANG et al., 2010. Para tal, adicionou-se 50 mL de ácido ascórbico 0,1 mol L^{-1} em 50 mL de óxido de grafeno 0,1 mg mL^{-1} . Agitou-se a mistura por 30 min. sob aquecimento de 70 $^{\circ}\text{C}$. O produto foi centrifugado

em 10.000 rpm e descartou-se o sobrenadante. O sólido de corpo de fundo foi lavado com álcool etílico absoluto PA Synth e água três vezes, e seco em estufa a 120 °C.

3.4 Caracterização do óxido de grafeno reduzido

Os espectros de ultravioleta-visíveis (UV-vis) foram coletados em um espectrofotômetro JASCO V-630 com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A espectroscopia de Raman foi realizada no equipamento WITec alpha300 RAS, para mostrar a variação da relação de intensidade entre as bandas D e G (ID/IG). Os difratogramas de raios X foram realizados no equipamento PerkinElmer Spectrum Frontier, enquanto a morfologia do rGO recém-sintetizado, foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) em um microscópio JOEL 2100 operando a 200 kV.

3.5 Caracterização física do dispositivo

Os dispositivos preparados foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ângulo de contato, Análises de Energia Dispersiva (EDS), e resistência de trilha (*Sheet Resistance*).

3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura- MEV

As fotomicrografias de MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV, corrente de 2,82 A e I probe de 200 pA. As amostras foram recobertas com 6nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente = 60 mA; taxa de deposição 0,60 nm s⁻¹).

3.5.2 Ângulo de contato

Os dados de ângulo de contato foram medidos de acordo com o ângulo do contato dinâmico entre uma gota de água deionizada e a superfície plana de cada amostra de dimensões de 1 cm de largura por 1 cm de comprimento. O equipamento utilizado foi o goniômetro CAM 200 KSV *Instruments* e o software de análise de imagem utilizado foi

CAM 2008. Os parâmetros de processamento consistiram na obtenção de um total de 500 imagens em um intervalo de 1 s entre elas. O volume da gota de água depositada sobre o substrato foi de 4 µL.

3.5.3 Análises de Energia Dispersiva- EDS

As análises EDS foram realizadas também na CAQI/IQSC/USP, em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 300), com detector de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (*Atmosphere Thin Window*), de resolução de 133 eV à 5,9 keV e área de 10 mm² quadrado, acoplado a um Microscópio Eletrônico ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, *dead time* de 30%, corrente de 2,82 A e I probe de 2,5 nA. A área da amostra analisada foi de 320×320 µm.

3.5.4 Resistência de trilha condutora- RS

Medidas de resistência de trilha (do inglês *sheet resistance*) foram usadas para caracterizar a uniformidade do recobrimento da pintura manual de lápis sobre o substrato papel. A resistência de trilha é expressa em unidades de ohms por centímetro quadrado e pode ser utilizada para comparar propriedades elétricas de dispositivos que são significativamente diferentes em tamanho. A Resistência de trilha (R_s) é descrita como:

$$R_s = R \frac{W}{L} \quad (2)$$

Onde R em ohms é a resistência medida, W é a largura da trilha e L é o comprimento da trilha condutora. Considerando RC como resistência de contato, um gráfico de variação da resistência corrigida ($\Delta R - 2RC$) em função da variação do comprimento da trilha (ΔL) foi plotado. A R_s foi então calculada a partir da multiplicação do coeficiente angular da equação de reta pela largura da trilha condutora produzida por lápis de grafite sobre papel. A resistência elétrica foi medida em multímetro digital Mimipa ETI-1100.

3.6 Caracterização eletroquímica do dispositivo

O desempenho dos dispositivos foi avaliado por voltametria cíclica (VC) em meio contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mmol L⁻¹ em eletrólito de KCl 0,1 mol L⁻¹. O

perfil de oxidação do etinilestradiol foi observado por voltametria de pulso diferencial (VPD). Ambas a técnicas eletroanalíticas foram realizadas utilizando um potenciostato modelo Autolab® e monitoradas pelo software NOVA 2.1. A **Figura 8** apresenta o dispositivo acoplado a um conector elétrico, antes e após receber a gota (50µL) de analito.

Figura 8. EPAD posicionado em um conector para leitura dos sinais eletroquímicos em um potenciostato Autolab®. A: dispositivo seco e B: dispositivo com 50µL de solução depositada sobre a área eletródica.

Fonte: Autoria própria.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização física do dispositivo

Na otimização do dispositivo, foi levada em consideração a caracterização do papel a ser selecionado como substrato, a caracterização do lápis de grafite a ser usado como material condutor e a rota de fabricação. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas para elucidar diferentes tipos de papel, expostas na **Figura 9**. A imagem do papel reciclado apresentado em (B) não revela diferenças estruturais significativas no arranjo das fibras de celulose quando comparado ao papel convencional em (A), mostrando ser tão eficaz para o emprego como suporte flexível quanto o papel sulfite (*Office Paper*). Optou-se então pelo papel reciclado buscando o uso responsável e sustentável de recursos naturais, uma vez que além das árvores poupadas de corte, o processo de reciclagem tem como vantagem a redução no uso de água e de energia, quando comparado às quantidades destes mesmos recursos utilizados na fabricação de papel virgem.

O papel reciclado recebeu então o tratamento a cera, resultando na imagem de microscopia em (C) e em seguida foi pintado à mão com lápis, apresentando cobertura da superfície por lâminas de grafite conforme a imagem em (D). Após pintado com o lápis de grafite, o papel recebeu fita dupla face no verso e o layout desejado foi cortado fazendo uso de uma cortadora a laser. O laser foi incidido pelo lado do papel com a fita dupla face, para que o recobrimento de grafite não sofresse desgaste devido ao contato direto com o calor do feixe. Uma vez cortado, o desenho foi colado em um segundo papel reciclado, dessa vez com uma camada mais grossa de cera, exibida em (E). A função dessa segunda plataforma mais hidrofóbica é garantir que a gota de analito fique suspensa e isolada na área eletroquímica, além de permitir que a área de trabalho possa ser facilmente modificada pelas gotas da suspensão de nanomaterial.

Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para A) papel sulfite Office Paper Chamex; B) Papel Reciclado Eco Chamex; C) Papel reciclado impresso a cera com tratamento térmico em chapa aquecida a 120 °C por 2 min; D) Papel reciclado impresso a cera e com desenho de lápis de grafite; E) Papel reciclado impresso a cera e com tratamento térmico em estufa a 50 °C por 1 min. Amplificação de 1000 ×.

Fonte: Autoria própria.

Os aglomerados entre as fibras observados na **Figura 9A** são partículas de carbonato de cálcio (CaCO_3) utilizadas no processo industrial de fabricação do papel sulfite linha Office Paper alcalino. De acordo com o site do fabricante *International Paper*, o carbonato de cálcio tem a função de tornar o papel mais branco, aumentando a durabilidade do material e retardando o envelhecimento (aspecto amarelado) que ocorre com o tempo. A **Figura 10** traz um mapa composicional dos elementos químicos presentes na ampliação da **Figura 9A**, apresentando a intensidade de contraste em carbono (C), oxigênio (O) e cálcio (Ca).

Figura 10. Mapa composicional dos elementos químicos presentes na microscopia da Figura 4A: a) microscopia de ampliação 3.500 ×, com contraste em: b) carbono, c) oxigênio e, d) cálcio.

Fonte: Autoria própria.

Os valores de ângulo de contato foram determinados pelo método da gota séssil e utilizados para apontar as alterações em hidrofobicidade/hidrofilicidade que ocorreram no papel reciclado devido ao tratamento com cera. O ângulo de contato medido por este método é aquele formado entre a superfície do sólido e uma das tangentes da superfície da gota que passa por qualquer ponto que separa os três estados do sistema, ou seja, líquido, sólido e gasoso. A **Figura 11A** apresenta um diagrama explicativo sobre o método empregado na obtenção dos valores de ângulo de contato médio, ilustrando que ele foi determinado pela média dos ângulos do lado direito e lado esquerdo da gota. As **Figuras 11B e 11C** trazem as imagens captadas por uma câmera digital (tempo = 1 segundo) e seus respectivos ângulos de contato médios calculados a partir da média de três repetições. A partir dos cálculos, podemos constatar que o ângulo de contato do papel reciclado aumentou em 23,68% após receber o tratamento com cera.

Figura 11. Imagens de gotas de água depositadas sobre a superfície do papel (no tempo 1 segundo) para cálculo do ângulo de contato. (A) Diagrama esquemático do cálculo do ângulo de contato, onde θ_1 representa o lado direito e θ_2 o lado esquerdo da gota. (B) A Amostra de papel reciclado e (C) papel reciclado após tratamento com cera.

Fonte: Autoria própria.

A superfície hidrofóbica obtida facilita o controle de líquido no dispositivo e garante maior robustez. Fato que é corroborado pela **Figura 12**, onde é possível observar um protótipo inicial do dispositivo com uma gota de 50 μL de solução de corante azul cobrindo apenas a área eletródica desejada.

Figura 12. Imagem do protótipo inicial do dispositivo após ser depositada uma gota de 50 μL de corante sobre a área eletródica.

Fonte: Autoria própria.

A técnica de EDS foi utilizada para elucidar a composição atômica relativa da mina de lápis Faber Castell Regent 9000 de diferentes graduações diferentes: B, 2B, 3B, 4B, 6B e 8B. Os dados obtidos (**Tabela 1**) corroboram a premissa de que quanto maior a graduação do lápis, maior é a composição de grafite (forma alotrópica do carbono) e menor a composição de matéria inorgânica, oriunda da argila. O grafite é um material condutor

elétrico composto por camadas de átomos de carbono hibridizados em sp^2 . Dessa forma, uma maior graduação de lápis garante um EPAD com menor resistência elétrica e melhor condutância. Tal característica pode ser observada por meio das curvas de resistência corrigida em função do comprimento de trilhas de substrato (papel reciclado) pintadas com lápis de grafite, conforme o gráfico da **Figura 13**.

Tabela 1. Composição atômica determinada por EDS das minas de lápis B, 2B, 3B, 4B, 6B e 8B.

Elementos	B (%)	2B (%)	3B (%)	4B (%)	6B (%)	8B (%)
Carbono (C)	74,00	78,99	80,02	81,79	82,24	82,46
Oxigênio (O)	19,89	15,92	15,29	14,01	14,04	14,57
Sódio (Na)	0,54	0,44	0,16	0,17	0,12	0,39
Magnésio (Mg)	0,05	0,03	0,04	0,03	0,02	0,03
Alumínio (Al)	2,30	1,77	1,86	1,55	1,48	0,98
Silício (Si)	2,68	2,23	2,29	2,09	1,82	1,26
Fósforo (P)	0,15	0,23	0,01	0,03	0,03	0,13
Potássio (K)	0,06	0,06	0,06	0,05	0,04	0,03
Cálcio (Ca)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03
Titânio (Ti)	0,12	0,13	0,12	0,11	0,08	0,07
Ferro (Fe)	0,17	0,17	0,11	0,14	0,09	0,06

Fonte: Autoria própria.

Figura 13. Comparação da resistência elétrica de trilhas lápis, de diferentes graduações, medidas em tiras de papel reciclado, hidrofobizadas com cera.

Fonte: Autoria própria.

A partir do valor de inclinação das retas multiplicado pela largura das tiras utilizadas (0,5 cm), o valor de resistência de trilha foi calculado. A Tabela 2 traz a relação de valores.

Tabela 2. Valores de resistência para as trilhas condutoras desenhadas no papel reciclado hidrofobizado utilizando diferentes lápis.

Lápis	Resistência ($K\Omega\text{ cm}^{-1}$)
B	$1,26 \pm 0,12$
2B	$1,13 \pm 0,04$
3B	$0,99 \pm 0,04$
4B	$0,68 \pm 0,05$
6B	$0,33 \pm 0,007$
8B	$0,18 \pm 0,001$

Fonte: Autoria própria.

O menor valor de resistência de trilha alcançado foi de $180\ \Omega\text{ cm}^{-1}$, com o lápis de graduação 8B. Tal lápis apresentou também o menor valor de desvio padrão, uma vez que sua maciez permite que a pintura seja mais fácil, garantindo uniformidade e constância em diferentes trilhas. Uma vez escolhido o lápis, foi então investigada a influência na resistência gerada por diferentes tipos de papéis como substrato, conforme exibido na **Figura 14**.

Figura 14. Comparação da resistência elétrica de diferentes papéis medidas em tiras desenhadas com lápis 8B.

Fonte: Autoria própria.

A resistência de trilha da tira de papel cromatográfico foi drasticamente maior ($412 \pm 0,03 \, \Omega \, \text{cm}^{-1}$) que do papel sulfite ($184 \pm 0,00 \, \Omega \, \text{cm}^{-1}$) e do papel reciclado ($180 \pm 0,00 \, \Omega \, \text{cm}^{-1}$). Além disso, concluiu-se a partir desta comparação, que a hidrofobização antes de pintar a tira com o lápis garante uma resistência de trilha de $93,9 \pm 0,01 \, \Omega \, \text{cm}^{-1}$, ou seja, a trilha torna-se 52% menos resistiva à passagem de corrente elétrica do que quando usado o papel reciclado puro. Optou-se então por aplicar o tratamento a cera em toda a extensão do papel reciclado a ser utilizado como substrato, explorando a hidrofobização tanto para manejar a gota de analito quanto para reduzir a resistência elétrica do substrato.

A técnica de EDS foi também utilizada para verificar a formação da camada de cloreto de prata (AgCl) sobre a prata (Ag) do eletrodo de referência em um EPAD finalizado, conforme sumarizado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Composição atômica da superfície do eletrodo de referência (RE).

Elemento	Porcentagem atômica (%)
Prata (Ag)	28,44
Cloro (Cl)	4,88
Carbono (C)	66,67

A alta porcentagem de carbono é devida ao grafite do lápis 8B, uma vez que toda a extensão do EPAD foi pintada primeiramente com o lápis. A prata é referente à caneta de prata MG Chemicals®, e o cloro a camada superficial de cloreto de prata formada a partir da reação com hipoclorito. Verifica-se, portanto, que a camada de $\text{AgCl}_{(s)}$ foi formada com sucesso e permaneceu na superfície do eletrodo após a lavagem com água e secagem com jato de N_2 (g).

Logo, foi obtido um método econômico, rápido e eficiente de se fabricar EPADs com o papel reciclado. O dispositivo criado é pequeno, leve, flexível e com grande apelo visual, além de oferecer a vantagem de ser prototipado em grande número em um curto período de tempo, conforme **Figura 15**.

Figura 15. Protótipo final dos EPAD baseados em papel reciclado.

Fonte: Autoria própria.

4.2 Caracterização eletroquímica do dispositivo

4.2.1 Investigação do desempenho eletroquímico dos eletrodos por voltametria cíclica

O desempenho dos dispositivos foi avaliado por voltametria cíclica (VC) em meio contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mmol L⁻¹ em eletrólito de KCl 0,1 mol L⁻¹. A técnica de voltametria cíclica inicia-se com a aplicação de potencial em um valor no qual nenhuma reação ocorre. Em seguida, com a variação de potencial para regiões mais positivas (anódica), ocorre a oxidação do analito eletroativo em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial. No caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico da oxidação. O par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/^{4-}$, aqui escolhido para a VC de caracterização, é bastante utilizado como sonda de investigação por apresentar perfil redox conhecido. As seguintes reações ocorrem ao se aplicar um potencial:

Antes das medidas de caracterização, os eletrodos foram submetidos a um pré-tratamento para ativação e limpeza que consistiu em uma cronoamperometria durante 30 s em potencial de -2 V, seguida de 20 ciclos de voltametria cíclica de 0 a 1 V em meio ácido (H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$). A Figura 16 traz os voltamogramas de três eletrodos diferentes frente a sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, após o pré-tratamento, para investigação da reprodutibilidade. Enquanto na **Tabela 4** podemos conferir os valores de ΔE_p dos três EPAD.

Figura 16. Voltamogramas cíclicos de três diferentes EPAD, gerados em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mmol L^{-1} em eletrólito de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na velocidade de 50 mVs^{-1} , para investigação da reprodutibilidade.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4. Comparação dos valores de ΔE_p de três diferentes EPAD.

Eletrodos	ΔE_p
01	$0,635 \pm 0,065$
02	$0,639 \pm 0,065$
03	$0,750 \pm 0,065$
Média	$0,675 \pm 0,065$

Fonte: Autoria própria.

A vida útil dos EPAD foi investigada por meio de uma sequência de 150 voltamogramas cíclicos gerados na velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . Como pode ser observado na **Figura 17**, os valores de ΔE_p aumentaram conforme os ciclos avançaram, revelando que o sistema se tornou lentamente menos condutor devido ao lixiviamento da camada de grafite. Contudo, há uma transição lenta no perfil do sinal, o que comprova a robustez do sistema. Na **Figura 17B** podemos ver uma imagem de MEV do EPAD após os 150 ciclos, revelando pouco desgaste visual. A **Figura 17C** apresenta os ciclos 1, 50, 100 e 150, para melhor visualização do avanço do desgaste. Sendo assim, confirma-se a premissa de que os EPADs fabricados são descartáveis, porém ainda com robustez suficiente para suportar um tempo de meia vida longo sem perder o contato elétrico.

Figura 17. Voltamogramas cíclicos retratando a vida útil de um EPAD, gerados em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na velocidade de 50 mVs^{-1} , para investigação da vida útil. A: ciclos de 1 a 150; B: microscopia eletrônica de varredura do EPAD após as 150 ciclagens; e C: voltamogramas dos ciclos 1, 50, 100 e 150.

Fonte: Autoria própria.

A etapa seguinte consistiu em modificar os EPAD com nanomateriais de carbono. Foram investigadas as seguintes suspensões de materiais: nanotubos de carbono suspenso em DMF; óxido de grafeno suspenso em água; e óxido de grafeno reduzido suspenso em DMF.

Buscando explorar estratégias sustentáveis também na etapa de modificação, utilizou-se uma abordagem simples e verde na síntese do óxido de grafeno reduzido a partir do óxido

de grafeno usando ácido L-ascórbico como agente redutor. O composto foi caracterizado por espectroscopia de absorção no UV-Vis, espectroscopia Raman, TEM e difração de Raio-X. O espectro de absorção UV-vis do GO da literatura geralmente exibe picos de absorção característicos em 225 nm e um ombro a cerca de 300 nm, devido a ligações $\pi \rightarrow \pi^*$ de carbono aromático e $n \rightarrow \pi^*$ de transição de ligações C=O, respectivamente.

No espectro do GO obtido experimentalmente, **Figura 18**, é exibida uma banda de absorção $\pi - \pi^*$ em 231 nm e uma banda de absorção $n - \pi^*$ no ombro a 296 nm, enquanto o pico da transição $\pi - \pi^*$ muda para 265 nm no rGO (**Figura 19**), sugerindo restauração parcial da rede aromática e caracterizando o composto como sendo o óxido de grafeno reduzido.

Figura 18. Espectros de UV-Vis da solução de GO.

Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Espectros de UV-Vis da amostra de rGO reduzida via ácido L-ascórbico.

Fonte: Autoria própria.

No espectro Raman do RGO (**Figura 20**), os picos centrados em 1354 e 1590 cm^{-1} são atribuídos às bandas D e G, as quais estão relacionadas com os átomos de carbono sp^2 -ligados e aos átomos de carbono desordenados, respectivamente. Quando comparado ao espectro do GO teórico, observa-se um aumento da intensidade relativa da banda D promovendo, consequentemente, um aumento na razão I_D/I_G . Tal mudança está associada ao efeito de borda produzido pelo aumento global no número de planos de borda em função do elevado número de camadas únicas de RGO.

Figura 20. Espectros Raman da amostra de rGO reduzida via ácido L-ascórbico. Detalhe: Micrografia do material com escala de 90 μm .

Fonte: Autoria própria.

Nos difratogramas de raio-x (Figura 21), após a redução é possível observar o surgimento de uma banda pequena entre $40^\circ < 2\theta < 50^\circ$, que pode ser associada com um espaçamento entre as camadas do rGO, que indica que as folhas do rGO são fracamente empilhadas.

Figura 21. Difratogramas da amostra de rGO reduzida via ácido L-ascórbico.

Fonte: Autoria própria.

A morfologia do rGO recém-sintetizado, foi avaliada também por Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) em um microscópio JOEL 2100 operando a 200 kV. A **Figura 22** mostra uma folha de rGO sobre um grid de lacey carbono. O rGO consiste em folhas agregadas aleatoriamente, com pequenas ondulações, condizente com os achados experimentais em literatura.(YANG et al., 2012)

Figura 22. Imagem de TEM do rGO.

Fonte: Autoria própria.

Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que é possível obter com sucesso óxido de grafeno reduzido (rGO) via ácido L-ascórbico.

Ao avaliarmos o perfil redox da sonda frente aos diferentes nanomateriais incorporados, podemos estudar as diferenças em condutância que ocorreram durante os processos de oxidação e redução, e sendo assim, avaliar qual proporciona melhor aperfeiçoamento da performance do dispositivo. Conforme a informação apresentada pela Figura 23, o óxido de grafeno (GO) foi o que apresentou menor valor de ΔE_p e perfil menos resistivo, porém a intensidade da corrente foi a menor dentre todos. Isso pode ser atribuído ao fato da carga negativa do GO repelir a sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, que também possui carga negativa. Já no óxido de grafeno reduzido há uma diminuição dos grupos funcionais negativos, uma vez que foram reduzidos, e por isso a sonda é atraída mais fortemente pela superfície da área eletrodica, exibindo um aumento da corrente de pico. O aumento da corrente pode também ser atribuído ao aumento da área superficial da região de trabalho,

uma vez que a modificação com rGO leva a uma superfície mais porosa. Os nanotubos de carbono, por sua vez, causaram piora no desempenho do dispositivo.

Figura 23. Voltamogramas cíclicos dos EPAD registrados em $\text{Fe(CN)}_6^{4-}/\text{Fe(CN)}_6^{3-}$ 5 mmol L^{-1} em KCl 1 mmol L^{-1} , em diferentes velocidades de varredura (10 a 50 mV/s), sendo o (A) sem modificação, (B) com adição de óxido de grafeno, (C) com adição de nanotubos, e (D) com adição de óxido de grafeno reduzido.

Fonte: Autoria própria.

Tais informações iniciais foram úteis para compreender o efeito das modificações no dispositivo, principalmente o potencial da aplicação do rGO sintetizado. O dispositivo modificado com rGO foi então investigado frente ao analito de interesse, etinilestradiol. A **Figura 24** traz o voltamograma cíclico do EPAD modificado com rGO, em comparação com o EPAD não modificado. Em ambos os voltamogramas é possível observar a oxidação do analito, que apresenta um único processo de oxidação em torno de + 0,55 V. Contudo é

visível o aumento da corrente no potencial de oxidação proporcionado pelo rGO, evidenciando a melhora do sinal de detecção.

Figura 24. Voltamogramas cíclicos dos EPAD modificados com nanomateriais de carbono frente ao analito etinilestradiol com concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão Britton-Robinson pH 7, gerados em velocidade de varredura de 50 mV/s.

Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S1) e outra ao final do pulso (S2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda (S1-S2), e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. O voltamograma resultante consiste em picos de corrente de forma gaussiana, cuja área deste pico é diretamente proporcional à concentração do analito. Fazendo uso de diferentes concentrações conhecidas podemos então registrar os valores de corrente de pico de oxidação do etinilestradiol e gerar uma curva analítica. A **Figura 25** traz um primeiro estudo que teve como objetivo encontrar a faixa de pH mais

apropriada para a reação de oxidação do etinilestradiol. Observa-se que conforme o pH da solução tampão aumenta há um deslocamento do pico para potenciais mais negativos (região catódica) e a intensidade da corrente aumenta.

Figura 25. Voltamogramas de pulso diferencial de solução $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de etinilestradiol em tampão BR nos pH 4, 7 e 11, utilizando célula convencional de carbono vítreo.

Fonte: Autoria própria.

Para análises eletroanalíticas, é preferível não trabalhar com potenciais muito extremos, a fim de evitar a oxirredução de interferentes presentes em uma matriz complexa. Sendo assim, escolheu-se o pH 7 como o mais apropriado para os estudos seguintes, uma vez que se trata de pH neutro e é o mais próximo do pH das amostras reais de águas tratadas e não tratadas que serão futuramente analisadas.

O etinilestradiol é pouco solúvel em água (11.3 mg/L at 27°C ou $3.81\text{e-}05 \text{ M}$) (DANNENFELSER; YALKOWSKY, 1991) e, portanto, a solução estoque foi preparada em etanol. A **Figura 26** traz uma imagem do estudo da influência do etanol na janela de potencial utilizada para observar a oxidação do etinilestradiol.

Figura 26. Comparação entre o voltamograma de pulso diferencial na presença do tampão Britton-Robinson pH 7 e o tampão com adição de etanol, na proporção utilizada na diluição.

Fonte: Autoria própria.

A ausência de pico de oxidação/redução na janela de potencial utilizada para a detecção do pico de oxidação do etinilestradiol comprova que a solução estoque em etanol é adequada para o estudo, sendo isenta de contribuições para falsos positivos ou supressão de sinal.

Construiu-se então uma curva analítica para o etinilestradiol em tampão BR pH 7 na faixa de 1 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ tendo como eletrodo de trabalho o carbono vítreo sem modificação, em célula convencional. A **Figura 27** exhibe os voltamogramas de pulso diferencial, enquanto a **Figura 28** apresenta a curva analítica obtida a partir da corrente de pico dos voltamogramas versus concentração (1 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). O etinilestradiol oxidou no potencial de aproximadamente 0,55 V e apresentou boa definição de pico. A equação da reta obtida foi $Y = 0,49 \cdot [\text{EE2}] - 0,10$, com R^2 de 0,9978. O limite de detecção (LD) foi calculado conforme o recomendado por Miller e Miller, e obteve-se 0,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 27. Voltamograma de pulso diferencial em carbono vítreo na presença de etinilestradiol, variando de 1 (a) a 8 (h) $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,0.

Fonte: Autoria própria.

Figura 28. Curva analítica referente a detecção de etinilestradiol em carbono vítreo, na faixa de 1 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,0.

Fonte: Autoria própria.

Uma segunda curva analítica foi então construída, nas mesmas condições, porém utilizando-se os EPAD reciclados. Os dispositivos de papel são mais resistivos e logo apresentam sensibilidade inferior quando comparados ao eletrodo de carbono vítreo. Sendo assim, a faixa de concentração utilizada na curva de calibração em carbono vítreo não manifestou nos EPAD picos de oxidação distinguível do branco. Picos bem definidos foram observados na faixa linear de 100 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme exibido na **Figura 29**. A equação da reta obtida foi $Y = 0,00165 \cdot [\text{EE2}] - 0,035$, com R^2 de 0,9868, conforme curva da **Figura 30**. O limite de detecção por Miller e Miller foi 57,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 29. Voltamograma de pulso diferencial no EPAD na presença de etinilestradiol, variando de 100 (a) a 500 (e) $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,0.

Fonte: Autoria própria.

Figura 30. Curva analítica referente a detecção de etinilestradiol em carbono vítreo, na faixa 100 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,0

Fonte: Autoria própria.

Comparando os voltamogramas de pulso diferencial em carbono vítreo com os em EPAD, vemos que não há considerável deslocamento no valor de potencial de oxidação. A sensibilidade ainda é um desafio, visto que o limite de detecção alcançado é inferior ao esperado. Contudo o EPAD oferece a vantagem de ser descartável, e sendo assim, cada ponto da curva foi gerado em um dispositivo novo de forma rápida e prática. Enquanto o carbono vítreo exigiu limpeza entre as corridas para evitar a supressão de sinal causada pela adsorção do composto, tornando a análise longa e laboriosa.

Por fim, construiu-se uma curva analítica para os EPAD modificados com Rgo. A corrente de pico aumentou consideravelmente, indicando melhora na sensibilidade do dispositivo (**Figura 31**). A equação da reta obtida foi $Y = 0,0048 \cdot [\text{EE2}] + 0,12$, com R^2 de 0,9787 (**Figura 32**). Contudo, o limite de detecção por Miller e Miller foi 120,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$ quando se esperava um LD menor do que 57,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (EPAD não modificado).

Tal divergência do LD calculado pode ser explicada pela linearidade da reta que foi prejudicada pela reprodutibilidade do EPAD modificado. Além disso, uma vez que o EPAD foi modificado com gotas de suspensão de rGO, não foram realizadas VC de ambientalização em tampão BR, visando evitar que o material fosse lixiaviado antes da detecção do hormônio.

Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial no EPAD modificado com rGO na presença de etinilestradiol, variando de 100 (a) a 500 (e) $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,0.

Fonte: Autoria própria.

Figura 32. Curva analítica referente a detecção de etinilestradiol em EPAD modificado com rGO, na faixa 100 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR pH 7,0

Fonte: Autoria própria.

Trabalhos futuros poderão investigar formas de aumentar a sensibilidade da detecção do EPAD, além de explorar formas mais consistentes de imobilizar nanomaterials de carbono em EPAD descartáveis. Outro grande desafio será a seletividade frente aos interferentes, visto que a água de descarte é uma matriz complexa composta de outras moléculas passíveis de oxidação/redução. Diferentemente de uma técnica cromatográfica, a eletroquímica não é capaz de separar os interferentes, apenas identificá-los. Moléculas com potencial redox próximos podem vir a gerar supressão de sinal. Logo a seletividade é uma figura de mérito que terá que ser otimizada na faixa de potencial selecionada para detecção. Contudo, o custo e o tempo de análise são indicadores promissores para que se invistam pesquisas em EPADs.

5 CONCLUSÕES

Em conclusão, foi alcançado um método economicamente viável, simples e conveniente para se fabricar um novo dispositivo eletroanalítico descartável baseado na transferência direta de grafite de um lápis Faber Castell para substrato de papel reciclado, capaz de detectar etinilestradiol (EE2) em meio aquoso. O processo de fabricação dos protótipos se mostrou rápido e eficiente, sendo possível produzir diversos dispositivos em curto tempo, fazendo uso de instrumentação rotineira. O lápis de grafite escolhido foi o de graduação 8B, devido a maior graduação ser mais “macia”, garantindo melhor deposição das lâminas condutoras e menor resistência elétrica. Já em relação ao substrato, optou-se pelo papel reciclado por estratégia sustentável, uma vez que as características físicas são similares a do *Office paper* (sulfite comum), o que possibilita facilidade de manipulação na rota de fabricação escolhida e suporte flexível para os eletrodos. O tratamento do papel com cera mostrou-se eficaz para garantir o aumento da hidrofobicidade que auxilia no manejo da gota de analito, ou seja, o controle do fluido aplicado ao microdispositivo. A análise de reprodutibilidade do dispositivo avaliada pela voltametria cíclica do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ revelou um valor de ΔE_p de 0,6743 V, sendo este mais resistivo que o esperado. Uma desvantagem dos EPAD desenhados a lápis definitivamente é a dificuldade em reproduzir os eletrodos, uma vez que as diferenças de pressão durante o desenho afetam a deposição do material condutor no papel. A técnica apresentada pode ser considerada difícil de expandir para produção em massa e comercial, mas os *hand drawing* EPAD não deixam de ser úteis para ensino na universidade, pesquisa e prototipagem em laboratório. O estudo de modificações da área eletródica com nanomateriais de carbono foi útil para selecionar o óxido de grafeno reduzido (rGO) como o mais indicado para aprimorar a detecção direta da molécula redox. Além de ter sido possível sintetizá-lo por rota verde (via ácido ascórbico) e caracterizá-lo por diferentes análises físico-químicas (UV-VIS, Raman, TEM e difração de raios-x). Com relação a detecção da molécula alvo, o hormônio EE2, obteve-se curva analítica em carbono vítreo na faixa de concentração de 1 a 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9978$), realizada por voltametria de pulso diferencial. Enquanto para o EPAD descartável, a melhor curva analítica foi obtida na faixa de 100 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9868$). Os limites de detecção calculado por Miller e Miller foram de 0,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 57,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Almejava-se testar o dispositivo frente a amostra ambiental real da água tratada de São Carlos, porém a análise de HPLC da água pré-concentrada por SPE não acusou presença significativa do analito na água da torneira. É pouco provável que os EPADs para

monitoramento ambiental substituam as existentes técnicas de detecção instrumentadas, provavelmente servirão como um meio fácil de complementar a metodologia atual, uma vez que são passíveis de serem facilmente levados ao campo. O baixo custo e o tempo de detecção rápida dos μ PADs têm o potencial de proporcionar monitoramento de rotina em grandes áreas geográficas e por longos períodos, fornecendo muitas medições individuais. Precisa-se trabalhar no método para que a sensibilidade seja adequada e para superar o desafio da seletividade frente aos interferentes presentes na matriz. Contudo, políticas públicas no sentido de melhorar a distribuição e a usabilidade de EPADs ambientais podem fornecer ferramentas para melhoria da qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERINI, C. L.; HUGHES, I. A. Endocrine disrupting chemicals: A new and emerging public health problem? **Archives of Disease in Childhood**, v. 91, n. 8, p. 633–638, 2006.
- ATAIDE, V. N. et al. Electrochemical paper-based analytical devices: Ten years of development. **Analytical Methods**, v. 12, n. 8, p. 1030–1054, 2020.
- BROSSA, L. et al. Application of on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry to the determination of endocrine disruptors in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1–2, p. 287–294, 2002.
- BUSA, L. S. A. et al. Advances in microfluidic paper-based analytical devices for food and water analysis. **Micromachines**, v. 7, n. 5, 2016.
- CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–7095, 2009.
- CHAGAS, C. L. S. et al. Hand drawing of pencil electrodes on paper platforms for contactless conductivity detection of inorganic cations in human tear samples using electrophoresis chips. **Electrophoresis**, v. 36, n. 16, p. 1837–1844, 2015.
- DANIEL, M. D. S.; DE LIMA, E. C. Determinação simultânea de estriol, β -estradiol, 17 β -etinilestradiol e estrona empregando-se extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 4, p. 445–458, 17 out. 2014.
- DANNENFELSER, R. M.; YALKOWSKY, S. H. Data base of aqueous solubility for organic non-electrolytes. **Science of the Total Environment**, The, v. 109–110, n. C, p. 625–628, 1991.
- DIAS, A. A. et al. Detection of Analgesics and Sedation Drugs in Whiskey Using Electrochemical Paper-based Analytical Devices. **Electroanalysis**, v. 30, n. 10, p. 2250–2257, 2018.
- DOSSI, N. et al. Pencil-drawn paper supported electrodes as simple electrochemical detectors for paper-based fluidic devices. **Electrophoresis**, v. 34, n. 14, p. 2085–2091, 2013a.
- DOSSI, N. et al. Pencil-Drawn Dual Electrode Detectors to Discriminate Between Analytes Comigrating on Paper-Based Fluidic Devices but Undergoing Electrochemical Processes with Different Reversibility. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2515–2522, 2013b.
- DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 14, p. 5821–5826, 15 jul. 2009.
- ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.
- LI, W. et al. Fully-drawn pencil-on-paper sensors for electroanalysis of dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 769, p. 72–79, 2016.
- LIMA, D. R. S. et al. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas Brasileiras: Ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1043–1054, 2017.
- LOPES, L. G. et al. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de jaboticabal - São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639–643, 2010.

MANZ, A. et al. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. Capillary electrophoresis on a chip. **Journal of Chromatography A**, v. 593, n. 1–2, p. 253–258, 1992.

MARTINEZ, A. W. et al. Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699–3707, 2008.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. Diagnostics for the Developing World Microfluidic.pdf. v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010.

MARTÍNEZ, N. A. et al. Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 723, p. 27–32, 2012.

MCDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 7, p. 491–499, 2002.

MENTELE, M. M. et al. Microfluidic paper-based analytical device for particulate metals. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 4474–4480, 2012.

MORBIOLI, G. G. et al. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 970, p. 1–22, 2017.

NERY, E. W.; KUBOTA, L. T. Sensing approaches on paper-based devices: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7573–7595, 2013.

NIE, Z. et al. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 4, p. 477–483, 2010.

NODEHI, M. et al. Electrochemical quantification of 17α – Ethinylestradiol in biological samples using a Au/Fe₃O₄@TA/MWNT/GCE sensor. **Materials Chemistry and Physics**, v. 244, n. July 2019, p. 122687, 2020.

ORZARI, L. O. et al. Disposable electrode obtained by pencil drawing on corrugated fiberboard substrate. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 264, p. 20–26, 2018.

PAVINATTO, A. et al. Layer-by-Layer assembled films of chitosan and multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical detection of 17α-ethinylestradiol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 755, p. 215–220, 2015.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 1012–1021, 2002.

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

PETRUKHIN, O. M.; MAKSIMENKO, O. O. Sensors in analytical chemistry. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 2413–2417, 2008.

ROBINSON, C. D. et al. Effects of sewage effluent and ethynyl oestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*, Pallas). **Aquatic Toxicology**, v. 62, n. 2, p. 119–134, 2003.

SANTHIAGO, M. et al. Flexible and Foldable Fully-Printed Carbon Black Conductive

- Nanostructures on Paper for High-Performance Electronic, Electrochemical, and Wearable Devices. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 28, p. 24365–24372, 2017.
- SANTHIAGO, M.; KUBOTA, L. T. A new approach for paper-based analytical devices with electrochemical detection based on graphite pencil electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 177, p. 224–230, 2013.
- SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1–4, p. 57–67, 2010.
- TURNER, A. P. F. Current trends in biosensor research and development. **Sensors and Actuators**, v. 17, n. 3–4, p. 433–450, 1989.
- XIA, Y.; SI, J.; LI, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 774–789, 2016.
- YANG, S. et al. A facile green strategy for rapid reduction of graphene oxide by metallic zinc. **RSC Advances**, v. 2, n. 23, p. 8827–8832, 2012.
- YANG, Y. et al. Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 71–91, 2017.
- ZHANG, J. et al. Reduction of graphene oxide vial-ascorbic acid. **Chemical Communications**, v. 46, n. 7, p. 1112–1114, 2010.
- ZHU, W. J. et al. Bienzyme colorimetric detection of glucose with self-calibration based on tree-shaped paper strip. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 190, p. 414–418, 2014.
- MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Gosport: Pearson Education Canada, 2010. 296