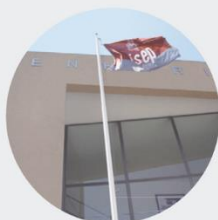




# Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para o etinilestradiol

**DIANA ISABEL MARTINS DIAS**

Outubro de 2021



## Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para o etinilestradiol

DIANA ISABEL MARTINS DIAS

outubro de 2021



Mestrado em Engenharia Química

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

# **Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para o etinilestradiol**

**Diana Isabel Martins Dias**

Orientadora: Professora Simone Morais – REQUIMTE-LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Co-orientador: Doutor Álvaro Torrinha – REQUIMTE-LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto

PORTO

OUTUBRO DE 2021

Este estudo foi suportado pelo projeto CECs(Bio)Sensing (PTDC/ASP-PES/29547/2017) e cofinanciado pelo Programa Operacional da Competitividade e Internacionalização (POCI -01-0145-FEDER- 029547) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia na sua componente OE. A componente da Universidade Federal do Ceará (Brasil) foi financiada pela FUNCAP (ref<sup>a</sup> FCT-00141-00011.01.00/18).





## Agradecimentos

Foi um enorme prazer ter realizado esta dissertação no GRAQ – Grupo de Reação e Análises Químicas e desde já agradeço a todos os responsáveis do grupo pela confiança e pela oportunidade.

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio de todos os que me acompanharam nesta fase da minha vida. Sendo assim gostaria de agradecer a todos os que tornaram possível a realização desta dissertação.

Agradeço ao meu co-orientador Doutor Álvaro Torrinha pela forma como me orientou e por toda a sua dedicação e disponibilidade. Agradeço à minha orientadora Professora Simone Morais pela disponibilidade e interesse com que sempre acompanhou o meu trabalho.

Por fim quero agradecer aos meus pais e ao meu irmão pelo positivismo e pelo amor que me transmitem, sem eles isto não seria possível.

O meu muito obrigada, a todos que fizeram parte desta conquista.



## Resumo

O etinilestradiol é um desregulador endócrino, detetado cada vez com mais frequência no meio aquático, que pode causar efeitos adversos nos ecossistemas, meio ambiente e nos seres vivos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sensor eletroquímico usando papel de fibra de carbono (CP) como transdutor para a deteção deste fármaco. O trabalho iniciou-se com a otimização do pré-tratamento do CP, uma vez que a limpeza e/ou ativação eletroquímica dos elétrodos são fatores críticos para o bom desempenho analítico. Diversos tipos de pré-tratamento foram avaliados por voltametria cíclica (CV), nomeadamente químicos e eletroquímicos com recurso a solventes orgânicos e ácidos, usando uma sonda eletroquímica à base de ferro (hexacianoferrato). Verificou-se que para o hexacianoferrato o pré-tratamento conferido ao CP melhora o seu comportamento eletroquímico em relação ao CP sem pré-tratamento, sendo o melhor pré-tratamento do CP constituído por imersão em banho de ultrassons numa solução de  $H_2SO_4$  1 M seguido de tratamento eletroquímico (CV) na mesma solução. De seguida, procedeu-se ao estudo do comportamento e mecanismo de reação de oxidação do fármaco etinilestradiol através da CV, verificando-se aqui que o elétrodo sem pré-tratamento apresenta melhor desempenho na deteção do etinilestradiol do que o elétrodo pré-tratado, sendo então aplicado um CP sem pré-tratamento no decorrer do trabalho, tornando os ensaios mais simples e rápidos. Os ensaios voltamétricos indicaram que o etinilestradiol apresenta apenas um pico de oxidação a cerca de + 0,53 V sendo então uma reação irreversível. Através da CV realizada a diferentes velocidades de varrimento, verificou-se que o mecanismo de reação de oxidação do etinilestradiol à superfície do sensor CP é controlado por adsorção. Posteriormente, otimizaram-se as condições analíticas, nomeadamente o pH da solução, os parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) e a deposição de analito. Para o eletrólito, obteve-se um pH ótimo de 7 enquanto que para os parâmetros DPV o valor determinado para a amplitude de modulação foi de 0,09 V, para o tempo de modulação de 0,003 s, para o tempo de intervalo de 0,1 s e para o degrau de potencial de 0,01 V. Relativamente à deposição de analito, obteve-se um tempo de deposição ótimo de 180 s e um potencial de deposição de + 0,4 V. A curva de calibração para o etinilestradiol foi realizada nas condições ótimas de 0,000100 a 6,00  $\mu M$ , verificando-se saturação para concentrações superiores a 4,00  $\mu M$ . O sensor CP revelou ser altamente sensível para o etinilestradiol refletindo-se em baixos valores de limite de deteção para as diferentes zonas de linearidade (0,00045 a 0,29  $\mu M$ ).

Por último, o sensor foi validado por ensaios de recuperação em água de rio (recolhida após uma ETAR) obtendo-se valores entre 88,3 e 109%. Globalmente, os resultados mostram que o sensor de CP pode trazer vantagens analíticas quer laboratorialmente, quer *in situ*, devido à facilidade de construção e bom desempenho analítico, podendo, assim, constituir uma alternativa viável aos elétrodos convencionais e aos métodos cromatográficos correntemente usados.

**Palavras-chave:** sensor eletroquímico; etinilestradiol; contaminante emergente; águas.

## Abstract

Ethinylestradiol is an endocrine disruptor, detected with increased frequency in the aquatic environment, that can cause adverse effects on ecosystems, environment and living beings. Thus, the objective of this work was to develop an electrochemical sensor using carbon fiber paper (CP) as a transducer for the detection of this drug. The work started with the optimization of the CP pretreatment since the electrochemical cleaning and/or activation of the electrodes are critical factors for improved analytical performance. Several types of pretreatments were evaluated by cyclic voltammetry (CV), namely chemical and electrochemical ones using organic solvents and acids, in an iron-based electrochemical probe (hexacyanoferrate). It was found that for hexacyanoferrate, the pretreatment given to the CP improves its electrochemical behavior compared to the CP without pretreatment, with the best CP pretreatment being constituted by immersion in an ultrasonic bath in a 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution followed by electrochemical treatment (by CV) in the same solution. Next, the behavior and reaction mechanism of the oxidation of ethinylestradiol were studied through CV, verifying that the electrode without pretreatment performs better in detecting ethinylestradiol than the pre-treated electrode. The voltammetric tests indicated that ethinylestradiol presents only one oxidation peak at about + 0.53 V, being therefore an irreversible reaction. Through the CV performed at different scan rates, it was found that the reaction mechanism of oxidation of ethinylestradiol in the CP sensor surface is controlled by adsorption. Subsequently, the analytical conditions were optimized, namely the solution pH, the parameters of the differential pulse voltammetry (DPV) and the analyte deposition. For the electrolyte, an optimum pH of 7 was obtained while for the DPV parameters the value determined for the modulation amplitude was 0.09 V, for the modulation time 0.003 s, for the interval time 0.1 s, and for the potential step 0,01 V. Regarding the analyte deposition, an optimal deposition time of 180 s and a deposition potential of + 0.4 V were obtained. The calibration curve for ethinylestradiol was performed at optimum conditions from 0.000100 to 6.00 μM, with saturation occurring for concentrations above 4.00 μM. The CP sensor proved to be highly sensitive for ethinylestradiol reflecting in low detection limits for the different linearity zones (0.00045 to 0.29 μM). Finally, the sensor was validated by recovery tests in river water (collected after a wastewater treatment plant) obtaining values between 88.3 and 109%. Overall, the results show that the CP sensor can bring analytical advantages both in the laboratory and on-site, due to its facile

construction and good analytical performance, thus being a viable alternative to conventional electrodes and chromatographic methods currently used.

**Keywords:** electrochemical sensor; ethinylestradiol; emerging contaminant; water.

## Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Contaminantes emergentes .....	1
1.2	Compostos farmacêuticos como importantes contaminantes emergentes .....	2
1.3	Análise de fármacos no meio ambiente .....	3
1.3.1	Métodos convencionais .....	3
1.3.2	Sensores eletroquímicos .....	4
1.3.3	Sensores eletroquímicos baseados em papel e tecido de fibra de carbono. 7	
1.4	Sensores eletroquímicos para o etinilestradiol.....	9
2	Objetivos .....	13
3	Metodologia experimental.....	15
3.1	Equipamento e material .....	15
3.2	Reagentes e soluções .....	15
3.2.1	Reagentes.....	15
3.2.2	Soluções.....	16
3.3	Procedimento experimental .....	16
3.3.1	Otimização do pré-tratamento do CP .....	16
3.3.2	Estudo do comportamento eletroquímico do etinilestradiol.....	17
3.3.3	Otimização das condições analíticas e determinação de etinilestradiol ...	17
3.3.4	Aplicação real do sensor - análise de uma amostra de água residual .....	18
4	Resultados e discussão .....	19
4.1	Otimização do pré-tratamento a conferir ao CP .....	19
4.2	Estudo do comportamento eletroquímico do etinilestradiol .....	22
4.3	Otimização das condições analíticas e determinação de etinilestradiol.....	25
4.4	Aplicação real do sensor - análise de uma amostra de água de rio.....	37
5	Conclusões .....	41

Bibliografia.....	43
A Anexos.....	51
A.1 Pré-tratamento.....	51

## Índice de figuras

Figura 1.1 – Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente (adaptado de [3, 6, 7]).	2
Figura 1.2 – Representação simplificada de um sensor eletroquímico (adaptado de [25, 26]).	5
Figura 1.3 – Célula eletroquímica com três elétrodos (adaptado de [31]).	6
Figura 1.4 – Representação de um voltamograma cíclico para uma espécie redox (hexacianoferrato), indicando a medição da intensidade dos picos anódico e catódico. Inserção: representação do perfil de potencial ao longo do tempo [32].	7
Figura 1.5 – Imagens de microscopia eletrónica de varrimento de a) papel fibra de carbono (CP) e b) tecido fibra de carbono (CC) [37].	8
Figura 3.1 – Elétrodo de CP revestido por papel de alumínio numa das extremidades.	15
Figura 4.1 – Voltamogramas cíclicos dos melhores pré-tratamentos.	20
Figura 4.2 – Comportamento do etinilestradiol por DPV com CP sem pré-tratamento e com CP pré-tratado com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M e electroquimicamente. As medições foram realizadas com 0,300 μM de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Parâmetros de DPV: tempo de modelação = 0,005 s, intervalo de tempo = 0,2 s, degrau de potencial = 0,01 V e amplitude de modelação = 0,07 V.	22
Figura 4.3 – Comportamento do etinilestradiol por voltametria cíclica. As medições foram realizadas com 1,00 μM de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Parâmetro de CV: velocidade de varrimento = 0,1 V/s.	23
Figura 4.4 – a) Voltamogramas cíclicos obtidos para otimização da velocidade de varrimento. b) Intensidade da corrente do pico (A) em função da velocidade de varrimento (V/s). c) Intensidade da corrente (A) em função da velocidade de varrimento <sup>1/2</sup> ((V/s) <sup>1/2</sup> ). As medições foram realizadas com 10,0 μM de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7.	24
Figura 4.5 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização do pH. b) Intensidade da corrente em função do pH. As medições foram realizadas com 1,00 μM de etinilestradiol em 0,1 M BRB. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: tempo de modelação = 0,005 s; intervalo de tempo = 0,2 s; degrau de potencial = 0,01 V e modulação da amplitude = 0,04 V.	26
Figura 4.6 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização da amplitude de modulação. b) Intensidade da corrente do pico em função da amplitude de modulação. As medições foram realizadas com 1,00 μM de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os	

parâmetros DPV usados foram os seguintes: degrau de potencial = 0,010 V, tempo de intervalo = 0,2 s e tempo de modulação = 0,005 s. .... 27

Figura 4.7 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização do tempo de modulação. b) Intensidade da corrente em função do tempo de modulação. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: degrau de potencial = 0,01 V, tempo de intervalo = 0,2 s e amplitude de modulação = 0,09 V. .... 29

Figura 4.8 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização do tempo de intervalo. b) Intensidade da corrente em função do tempo de intervalo. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: degrau de potencial = 0,01 V, tempo de modulação = 0,003 s e amplitude de modulação = 0,09 V. .... 30

Figura 4.9 – a) Voltamogramas obtidos para análise do degrau de potencial. b) Intensidade da corrente em função do degrau de potencial. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: tempo de intervalo = 0,1 s, tempo de modulação = 0,003 s e amplitude de modulação = 0,09 V. .... 31

Figura 4.10 – a) Voltamogramas obtidos para análise do tempo de deposição. b) Intensidade da corrente em função do tempo de deposição. As medições foram realizadas com 0,500  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7 utilizando as condições ótimas de pH e parâmetros DPV e um potencial de deposição = 0 V. .... 32

Figura 4.11 – Voltamogramas obtidos para análise do potencial de deposição. b) Intensidade da corrente em função do potencial de deposição. As medições foram realizadas com 0,500  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7 utilizando as condições ótimas de pH e parâmetros DPV e um tempo de deposição = 180 s. .... 33

Figura 4.12 – Determinação de etinilestradiol por DPV nas condições ótimas (pH do eletrólito = 7; modulação da amplitude = 0,09 V; tempo de modulação = 0,003 s; intervalo de tempo = 0,1 s; degrau de potencial = 0,01 V; tempo de deposição = 180 s; potencial de deposição = 0,4 V). a) Voltamogramas obtidos na análise de concentrações crescentes de etinilestradiol. b) Curva de calibração na gama de 0,000100 – 6,00  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol. .... 34

Figura 4.13 – Curvas de calibração correspondentes às diferentes zonas de linearidade. a) 0,000100 – 0,00100 $\mu$ M. b) 0,00100 – 0,0100 $\mu$ M. c) 0,0100 – 0,100 $\mu$ M. d) 0,100 – 1,00 $\mu$ M. ....	35
Figura 4.14 – Voltamogramas obtidos por DPV na análise de uma amostra de água de rio (pH do eletrólito = 7; modulação da amplitude = 0,09 V; tempo de modulação = 0,003 s; intervalo de tempo = 0,1 s; degrau de potencial = 0,01 V; tempo de deposição = 180 s; potencial de deposição = 0,4 V). ....	38
Figura A.1 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de acetona, etanol e água. ....	51
Figura A.2 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos diluídos. ....	52
Figura A.3 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos concentrados. ....	53
Figura A.4 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos eletroquímicos com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	54
Figura A.5 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos diluídos e etanol. ....	56
Figura A.6 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos diluídos e acetona. ....	57
Figura A.7 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos 3 M e etanol. ....	58
Figura A.8 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos 1 M e eletroquímico. ....	59
Figura A.9 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de acetona/etanol e electroquimicamente com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M. ....	60



## Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Sensores CP e CC utilizados na análise de fármacos. ....	9
Tabela 1.2 – Sensores eletroquímicos reportados na literatura para a deteção de etinilestradiol. ....	10
Tabela 1.2 – Sensores eletroquímicos reportados na literatura para a deteção de etinilestradiol: Continuação.....	11
Tabela 4.1 – Parâmetros para avaliação de uma reação reversível por voltametria cíclica. ....	21
Tabela 4.2 – Resultados associados à calibração do etinilestradiol. ....	37
Tabela 4.3 – Resultados obtidos na análise de uma amostra de água de rio. ....	39
Tabela A.1 – Parâmetros para avaliação dos elétrodos pré-tratados em ácidos diluídos. ....	52
Tabela A.2 – Parâmetros para avaliação dos elétrodos pré-tratados em ácidos concentrados. ....	54
Tabela A.3 – Parâmetros para avaliação dos elétrodos pré-tratados eletroquimicamente com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	55
Tabela A.4 – Parâmetros para avaliação dos elétrodos pré-tratados em ácidos diluídos e etanol. ....	56
Tabela A.5 – Parâmetros para avaliação dos elétrodos pré-tratados em ácidos 3 M e etanol. ....	58
Tabela A.6 – Parâmetros para avaliação dos elétrodos pré-tratados em ácidos diluídos e eletroquímico. ....	59



## Lista de abreviaturas

Ab	Anticorpo;
ABA	Ácido 4-aminobenzoico;
AgNPs	Nanopartículas de prata;
AuNPs	Nanopartículas de ouro;
BDD	Eléctrodo de diamante dopado com boro;
CB	Negro de fumo;
CC	Eléctrodo tecido de carbono;
Cdot	<i>Dot</i> de carbono;
CEs	Contaminantes emergentes;
Chit	Quitossano;
CNPs	Nanoesferas de carbono;
CNT	Nanotubos de carbono;
CoPc	Ftalocianina de cobalto;
CP	Eléctrodo de papel de carbono;
CPE	Eléctrodo de pasta de carbono;
CV	Voltametria cíclica;
DPV	Voltametria de pulso diferencial;
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] cloridrato de carbodiimida;
FeNPs	Nanopartículas de ferro;
FTO	Eléctrodo de flúor;
GA	Glutaraldeído;
GCE	Eléctrodo de carbono vítreo;
GO	Óxido de grafeno;
GQD	Quantum <i>dots</i> de grafeno;
HMDE	Eléctrodo de mercúrio;
HRP	Peroxidase de rábano;
ITO	Eléctrodo de Índio;
MIP	Polímero molecularmente impresso;
MWCNT	Nanotubos de carbono de parede múltipla;
NHS	N- hidroxisulfo-succinimida;
NiTPPS	Ni(II)tetraquis(4-sulfonatofenil) porfirina;



NiTsPc	Ftalocianina de níquel;
PAN	Poliacrilonitrilo;
PVP	Polivinilpirrolidona;
rGO	Óxido de grafeno reduzido;
SPCE	Eléctrodo de carbono impresso;
SPE	Eléctrodo impresso;
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples;
TA	Ácido tânico.

# 1 Introdução

## 1.1 Contaminantes emergentes

Os oceanos, mares e rios são geralmente o destino final dos mais variados tipos de efluentes devido à capacidade de transporte da água, levando assim à inevitável presença de poluentes, com destaque para os contaminantes emergentes (CEs) [1, 2]. Os CEs são compostos químicos (poluentes) que podem apresentar efeitos adversos ao meio ambiente e aos seres vivos, devido às suas potenciais características de persistência, bioacumulação e toxicidade e cuja regulamentação e legislação é ainda escassa ou inexistente [1, 3]. Nas últimas décadas tem havido consciência ecológica na utilização destes compostos, dado os seus potenciais impactos negativos no meio ambiente e consequentemente na saúde humana [1, 4, 5]. Contudo, existe ainda pouca informação relativamente à presença e ao efeito destes compostos no meio ambiente [1, 2]. Existem dois tipos de CEs, os de origem antropológica como é o caso dos pesticidas, fármacos, produtos de beleza, fragrâncias, plastificantes, hormonas e entre outros, e os de origem natural tal como os microrganismos e toxinas de algas [1, 4].

A presença de CEs no meio ambiente ocorre por diferentes vias, como se pode verificar na Figura 1.1 [3, 6, 7]. Provavelmente, a principal fonte de contaminantes são as águas residuais [8]. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), globalmente cerca de 80% das águas residuais não são tratadas, o que leva à potencial ocorrência de substâncias perigosas, tanto químicas como biológicas, no meio aquático [8]. Mesmo quando as águas residuais são devidamente tratadas, uma questão relevante que surge é a eficácia desses mesmos tratamentos, uma vez que muitos destes poluentes são detetados em efluentes de estações de tratamento de águas residuais [9, 10]. Descargas ilegais de efluentes industriais são muitas vezes comuns, sendo também responsáveis pelo lançamento de contaminantes no meio ambiente dado que o processo de tratamento é dispendioso [11]. Outra grande via de contaminação depende-se com práticas agrícolas e agropecuárias, sendo nestes casos os solos contaminados, mas podendo depois ocorrer escoamentos para massas de água tanto de superfície como subterrâneas [12]. Os ecossistemas marinhos são assim os principais afetados por este problema [1, 4]. Contudo, a saúde humana pode também ser afetada indiretamente através do consumo de

espécies animais ou mesmo diretamente através do consumo de águas subterrâneas contaminadas [1, 4].

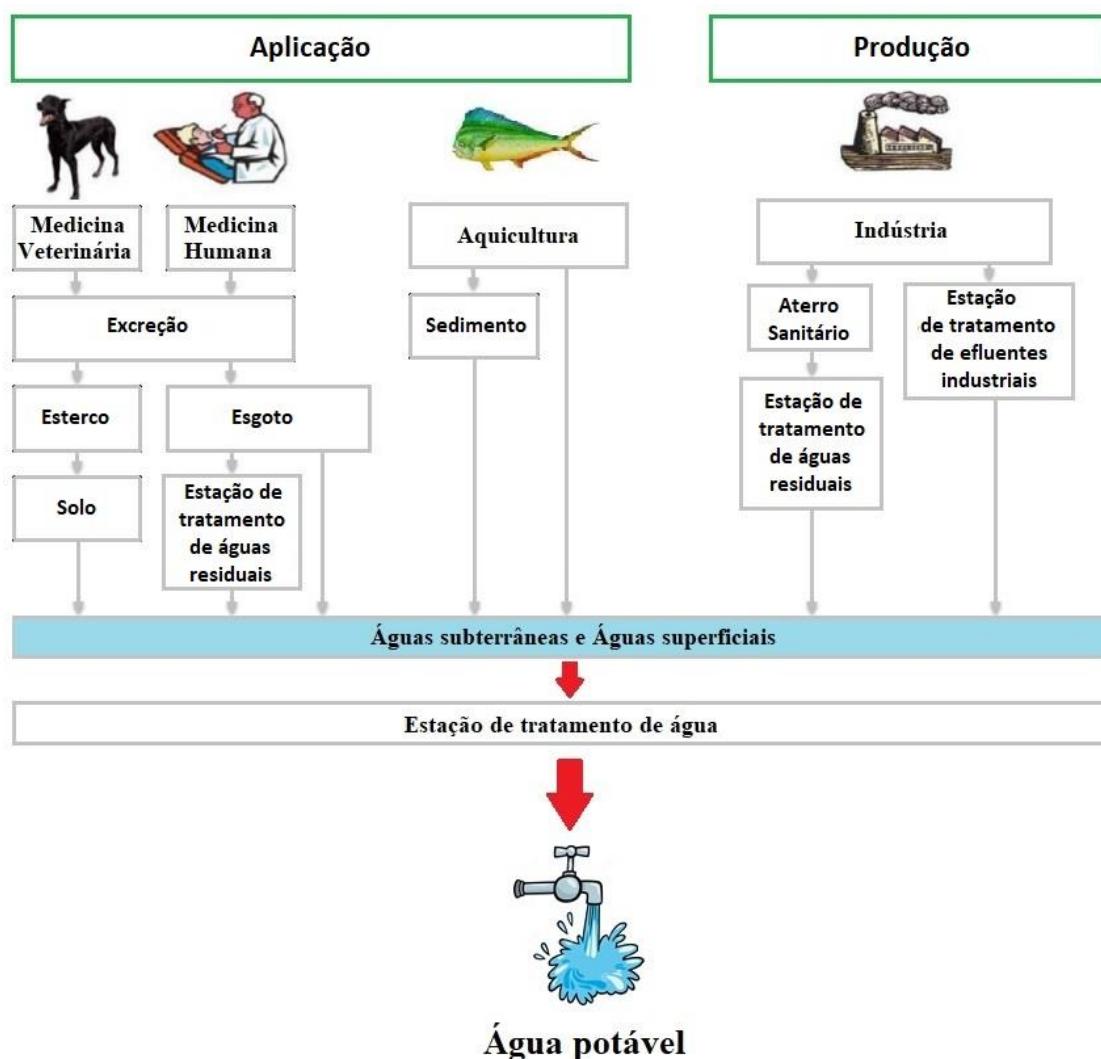


Figura 1.1 – Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente (adaptado de [3, 6, 7]).

## 1.2 Compostos farmacêuticos como importantes contaminantes emergentes

Os fármacos têm contribuído para a redução de doenças e mortalidade, promovendo a melhoria da qualidade de vida individual, mas quando libertados para o meio ambiente, estes podem ser considerados poluentes ambientais e causar efeitos adversos nos ecossistemas e na saúde humana. A elevada quantidade e diversidade de resíduos de fármacos produzidos e libertados pela sociedade tem levado a que o meio ambiente, em particular o meio aquático, esteja exposto à presença destes contaminantes emergentes [2, 6]. De referir ainda que este problema tende a exacerbar-se, uma vez que a toma de produtos farmacêuticos tem aumentado com o crescente envelhecimento da população e

aumento da população mundial [5, 6]. Isto faz com que os fármacos sejam considerados um grupo importante de CEs a ter em especial atenção, num futuro próximo, no que refere à criação de regulamentação apropriada [2].

A principal causa da ocorrência de fármacos no ambiente é a ineficiência dos tratamentos existentes para as águas residuais, podendo mesmo ocorrer balanços de massa negativos (metabólitos reconvertidos no composto mãe por ação do tratamento) [7]. Exemplo disto, são os vários estudos existentes na literatura que identificaram em águas residuais [13], águas superficiais [14] e águas subterrâneas [15], destinadas ao consumo humano, vários fármacos de diferentes classes terapêuticas tais como analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, antidepressivos, hormonas e entre outros [2, 6]. Apesar de muitos fármacos apresentarem uma boa e rápida degradação no meio ambiente, a frequência e a quantidade com que são lançados fazem com que sejam considerados como compostos pseudo-persistentes [16, 17]. Em termos de toxicidade, alguns fármacos são conhecidos por exercer um efeito disruptor no sistema endócrino, tal como as hormonas, certos anti-inflamatórios e antidepressivos [5, 16, 17]. Outra preocupação depreende-se com a capacidade dos antibióticos criarem resistência microbiana no meio aquático [18].

A presença destes compostos não é apenas detetada em águas, mas também em espécies marinhas, dado o poder bioacumulativo de muitos fármacos frequentemente lançados para o meio ambiente [19]. Existe, assim, um risco elevado de consumo de espécies marinhas contaminadas com fármacos [20]. Dado que Portugal é um dos maiores consumidores de peixe da União Europeia, estes riscos podem ter um efeito muito negativo em termos de saúde pública e em termos socioeconómicos [21].

### 1.3 Análise de fármacos no meio ambiente

#### 1.3.1 Métodos convencionais

As análises ambientais são correntemente realizadas por métodos convencionais de análise [5], em particular em técnicas de separação cromatográficas acopladas a espectrofotometria e a sistemas de deteção de espectrometria de massa. Os compostos farmacêuticos têm sido determinados por estes métodos em diversos tipos de amostras de água com concentrações que variam entre os ng/L e os µg/L [5, 10, 22]. Estes tipos de deteção permitem a análise de uma vasta gama de contaminantes emergentes, tendo a vantagem de apresentar elevada sensibilidade e seletividade devido à capacidade

separativa e de processamento simultâneo. Contudo, têm como desvantagem o uso de aparelhos complexos e volumosos que restringem as análises ao laboratório, impossibilitando o seu uso no local de amostragem. São ainda técnicas caras que necessitam de pessoal técnico altamente especializado para a sua correta operação. Em termos de sustentabilidade, estas técnicas também apresentam a desvantagem de usarem elevados volumes de amostra e solventes. Por sua vez, os sensores eletroquímicos poderão ser uma opção viável no que refere às análises ambientais *in loco* e de baixo custo [5].

### 1.3.2 Sensores eletroquímicos

A eletroanálise insere-se na tecnologia de sensores e é baseada nas reações eletroquímicas, mais concretamente na capacidade das espécies se oxidarem ou se reduzirem [23, 24]. Nesta tecnologia específica, um material condutor de eletrões denominado de transdutor (ou elétrodo) é utilizado para converter uma dada quantidade física num sinal elétrico, sendo este sinal posteriormente processado e amplificado no potencióstato/galvanostato e apresentado como gráfico num computador (Figura 1.2) [25, 26]. Os sensores eletroquímicos destacam-se pela sua simplicidade enquanto tecnologia, não necessitando de pessoal especializado para a sua operação, mas também pelas suas notáveis características [25, 27]:

- Sensibilidade: deteção de analitos com concentrações extremamente baixas;
- Seletividade: possibilidade de detetar um analito específico na presença de interferentes;
- Rapidez: tempo de resposta muito baixo e em tempo real;
- Reprodutibilidade: capacidade de obter os mesmos resultados quando a análise é feita por diferentes pessoas ou com diferentes sensores fabricados da mesma forma;
- Portabilidade: capacidade de miniaturização dos componentes e de autonomia, permitindo análises *in-situ*;
- Sustentabilidade: uso de reduzidos volumes de amostra e reagentes.

Os sensores eletroquímicos são também versáteis na forma como podem ser projetados e modificados, consoante a especificidade pretendida para a análise. O exemplo é o desenvolvimento de sistemas biológicos através da inclusão de entidades biológicas na construção do sensor, tal como microrganismos, enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos,

entre outros, sendo designados concretamente como biossensores. Estas entidades biológicas permitem um bioreconhecimento específico de compostos alvo, privilegiando assim a seletividade do sistema sensor [24].

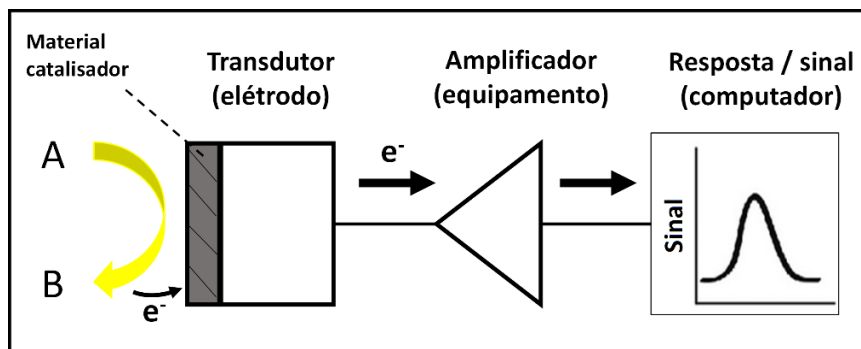


Figura 1.2 – Representação simplificada de um sensor eletroquímico (adaptado de [25, 26]).

Para a caracterização dos sensores eletroquímicos são usadas várias técnicas, nomeadamente as voltamétricas (voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial, *etc.*) e amperométricas (cronoamperometria), baseadas em fenómenos que ocorrem na interface entre a superfície do elétrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície (eletrólise da espécie em estudo) [24, 28].

Uma célula eletroquímica é constituída por três elérodos: elétrodo de trabalho (sensor no qual ocorre a reação eletroquímica), elétrodo de referência e elétrodo auxiliar. Esses elérodos são colocados em contacto com um eletrólito no estado líquido. Na voltametria, as informações sobre o analito são obtidas através de reações de oxidação-redução [24, 29].

Uma reação de oxidação resulta no fluxo de eletrões do elétrodo de trabalho para o elétrodo auxiliar e uma reação de redução resulta no fluxo de eletrões do elétrodo auxiliar para o elétrodo de trabalho. Esse fluxo de eletrões constitui uma corrente elétrica proporcional à concentração de analito em solução. O potencióstato deteta e amplifica a corrente elétrica. Na Figura 1.3 está representada uma célula eletroquímica com 3 elérodos [29, 30].



Figura 1.3 – Célula eletroquímica com três eléctrodos (adaptado de [31]).

A voltametria cíclica é uma técnica muito usada, principalmente para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, apresentando uma visão global dos processos que resultam de reações de oxidação-redução, que possam ocorrer num eléctrodo, por efeito da polarização eletroquímica [24, 28]. Nesta técnica ocorre um varrimento de potencial a uma velocidade constante entre um valor inicial e final, sendo depois o varrimento revertido até ao valor inicial [24, 30]. Quando o varrimento é realizado no sentido anódico (para potenciais mais positivos) obtém-se uma curva de polarização anódica e quando é efetuado no sentido catódico (para potenciais mais negativos) obtém-se uma curva catódica [24]. De uma forma simples, esta técnica é útil para se conhecer os potenciais (voltagem) a que ocorre a oxidação e/ou redução da espécie em estudo. A resposta do sistema é uma curva de intensidade de corrente em função do potencial aplicado, designada de voltamograma cíclico [24, 28].

Na Figura 1.4 está representado um voltamograma típico para a espécie redox hexacianoferrato, exemplificando a forma como determinar a intensidade da corrente e o potencial dos picos anódico (oxidação) e catódico (redução) [32].

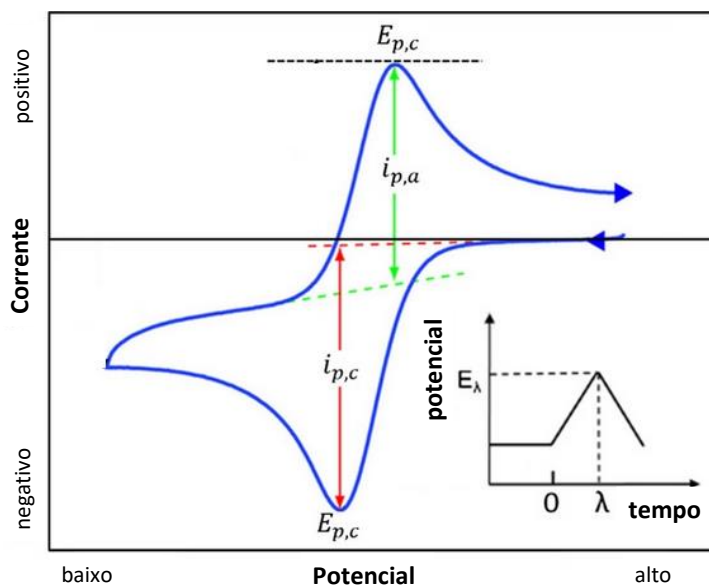


Figura 1.4 – Representação de um voltamograma cíclico para uma espécie redox (hexacianoferrato), indicando a medição da intensidade dos picos anódico e catódico. Inserção: representação do perfil de potencial ao longo do tempo [32].

### 1.3.3 Sensores eletroquímicos baseados em papel e tecido de fibra de carbono

A Engenharia de Materiais tem permitido o desenvolvimento de eléctrodos mais versáteis, mais estáveis, de fácil utilização, com alta sensibilidade e baixo custo instrumental e operacional [22]. Os eléctrodos à base de carbono apresentam boa condutividade eléctrica e área de superfície comparativamente aos eléctrodos convencionais, assim como uma excelente estabilidade química e afinidade para absorver moléculas orgânicas ou inorgânicas. O carbono nas suas diferentes formas está entre os materiais mais utilizados em eletroquímica devido ao seu custo acessível, elevada reprodutibilidade e sensibilidade, facilidade de utilização e rápida limpeza, o que permite a sua utilização de forma sucessiva [22, 33].

Os eléctrodos feitos de papel de fibra de carbono (CP – *carbon paper*) e tecido de fibra de carbono (CC – *carbon cloth*) são muito utilizados, principalmente em células de combustível devido à sua elevada porosidade, boa condutividade electrónica e elevada resistência mecânica e química. [33, 34]. Estas fibras são produzidas a partir do poliácridonitrilo (PAN). Durante a sua produção o polímero é esticado formando uma liga rígida e resistente. Segue-se depois uma etapa designada de estabilização, que consiste na oxidação das fibras numa atmosfera com O<sub>2</sub> a temperaturas de cerca de 200 °C, seguido da carbonização a 1000-1700 °C sob uma atmosfera inerte e possivelmente um último

tratamento a temperaturas mais elevadas, resultando em fibras com alto teor de carbono (> 90%) e excelentes propriedades mecânicas e eletrônicas [35, 36]. Ambos os materiais CC e CP apresentam um semelhante processo de fabrico, apresentando assim propriedades idênticas, contudo o CP tem uma forma mais rígida, uma vez que é usada uma resina para juntar as fibras de carbono numa matriz tipo papel (Figura 1.5a), enquanto que no CC essas fibras passam por um processo de tecelagem tendo assim a forma de um tecido (Figura 1.5b) [37].

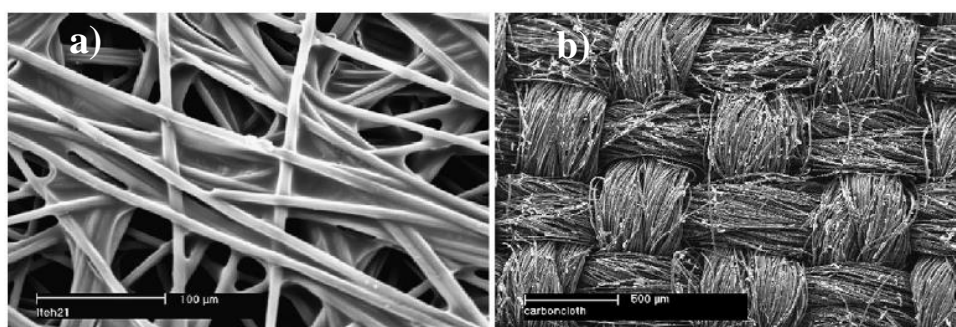


Figura 1.5 – Imagens de microscopia eletrónica de varrimento de a) papel fibra de carbono (CP) e b) tecido fibra de carbono (CC) [37].

O uso dos CP e CC, especificamente, como sensores eletroquímicos é ainda muito limitado e recente quando comparado com elétrodos mais convencionais, como por exemplo os GCE, CPE, HDME, SPCE, *etc.* Os sensores à base de CP e CC caracterizam-se por serem facilmente modificados com nanomateriais e polímeros através de diferentes tipos de métodos, sendo assim versáteis por serem ajustáveis a quaisquer dimensões, podendo ser miniaturizados, e por apresentarem uma elevada área de superfície o que garante uma elevada sensibilidade. Como expectável, a glicose é o analito mais estudado por sensores CP e CC dada a sua importância clínica, mas outros biomarcadores, biomoléculas e compostos tóxicos foram também analisados, como por exemplo o peróxido de hidrogénio, colesterol, ureia, ácido ascórbico, dopamina, metais pesados, nitrito, pesticidas e fenóis, entre outros [38]. No que diz respeito à análise de fármacos por este tipo de sensores, apenas 3 trabalhos foram identificados na literatura e referem-se à deteção dos fármacos progesterona (hormona) [22], ampicilina (antibiótico) [39] e cetoprofeno (anti-inflamatório) [40], estando as características destes sensores apresentadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Sensores CP e CC utilizados na análise de fármacos.

<b>Analito</b>	<b>Configuração do sensor</b>	<b>Limite de linearidade (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Limite de deteção (nM)</b>	<b>Referência</b>
<b>Progesterona</b>	CP/CNPs	$3,7 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$	0,012	[22]
<b>Ampicilina</b>	CC/Fe <sub>3</sub> N-Co <sub>2</sub> N/ <i>bisacrylamide</i> (MIP)	0,0056 - 1900	0,365	[39]
<b>Cetoprofeno</b>	CP	0,088 – 6,02	110	[40]

Assim a deteção de fármacos por sensores à base de CP e CC constitui uma oportunidade de investigação.

#### 1.4 Sensores eletroquímicos para o etinilestradiol

As hormonas usadas como fármacos devem merecer uma atenção especial no que respeita ao seu tratamento, assim como a sua deteção e controlo no meio ambiente devido ao elevado potencial toxicológico, uma vez que são considerados disruptores endócrinos [5, 16, 17]. Um exemplo relevante é a hormona sintética etinilestradiol, sendo amplamente prescrita como contraceptivo oral e, como consequência, encontrada com frequência em amostras ambientais aquáticas [41]. Na literatura existem já vários sensores eletroquímicos para a deteção desta hormona em específico, estando as suas características apresentadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Sensores eletroquímicos reportados na literatura para a detecção de etinilestradiol.

<b>Tipo de sensor</b>	<b>Configuração do sensor</b>	<b>Limite de linearidade (µM)</b>	<b>Limite de detecção (nM)</b>	<b>Referência</b>
<b>Sensor</b>	HMDE	0,0019 - 0,6	0,59	[42]
<b>Sensor</b>	CPE	0,05 - 20	30	[43]
<b>Imusosensor</b>	Au/Magnetic_beads_NH <sub>2</sub> -GA-Ab	-	6×10 <sup>-4</sup>	[44]
<b>Sensor</b>	GCE/MWCNT-nafion/NiTPPS	0,2 - 60	120	[45]
<b>Imusosensor</b>	GCE/MWCNT-nafion (Magnetic_beads-Ab)	2,4×10 <sup>-7</sup> - 4,8×10 <sup>-4</sup>	6,8×10 <sup>-5</sup>	[46]
<b>Sensor</b>	GCE/Ni	0,5 - 80	130	[47]
<b>Sensor</b>	FTO/Chit/CNT	0,05 - 20	90	[48]
<b>Biosensor</b>	GCE/SWCNT-Cdot/laccase/GA	0,05 - 7	4	[49]
<b>Imusosensor</b>	GCE/AgNPs-SiO <sub>2</sub> -GO/ABA-NaNO <sub>2</sub> /EDC-NHS/Ab/HRP-EE2	6,8×10 <sup>-4</sup> - 0,34	0,44	[50]
<b>Sensor</b>	HMDE	0 - 0,2	1,6	[51]
<b>Sensor</b>	BDD	1 - 5,2	240	[52]

Ab – Anticorpo; ABA - Ácido 4-aminobenzoico; AgNPs - Nanopartículas de prata; BDD - Eléctrodo de diamante dopado com boro; Cdot - Dot de carbono; Chit - Quitosano; CNT - Nanotubos de carbono; CPE - Eléctrodo de pasta de carbono; EDC - 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] cloridrato de carbodiimida; EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol; FTO - Eléctrodo de flúor; GA - Glutaraldeído; GCE - Eléctrodo de carbono vítreo; GO - Óxido de grafeno; HMDE - Eléctrodo de mercúrio; HRP - Peroxidase de rábano; MWCNT - Nanotubos de carbono de parede múltipla; NHS - N- hidroxisulfo-succinimida; NiTPPS - Ni(II)tetraquis(4-sulfonatofenil) porfirina; SWCNT- Nanotubos de carbono de parede simples.

Tabela 1.2 – Sensores eletroquímicos reportados na literatura para a deteção de etinilestradiol: Continuação.

<b>Tipo de sensor</b>	<b>Configuração do sensor</b>	<b>Limite de linearidade (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Limite de deteção (nM)</b>	<b>Referência</b>
<b>Sensor</b>	GCE/CB-Nafion	0,25 - 3	130	[53]
<b>Biosensor</b>	FTO/PVP-Chit-rGO/GA/laccase	$2,5 \times 10^{-7}$ - $2 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$	[54]
<b>Sensor</b>	GCE/MWCNT/CoPc	2,5 - 90	2200	[55]
	HMDE		33	
<b>Sensor</b>	SPCE	-	610	[56]
	SPCE(CNT)		650	
<b>Sensor</b>	GCE/Pd-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -MWCNT	2 - 150	500	[57]
<b>Sensor</b>	GCE/MWCNT/TA-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -AuNPs	0,01 - 120	3,3	[58]
<b>Sensor</b>	SPE/rGO-Nafion-GQD	0,01 – 2,5	2,6	[59]
<b>Sensor</b>	SPCE/Ni	0,23 - 30	52	[60]
<b>Sensor</b>	ITO/FeNPs/NiTsPc	0,07 - 30	7,8	[61]

AuNPs - Nanopartículas de ouro; CB - Negro de fumo; Chit - Quitosano; CNT - Nanotubos de carbono; CoPc - Ftalocianina de cobalto; FeNPs - Nanopartículas de ferro; FTO - Eléctrodo de flúor; GA - Glutaraldeído; GCE - Eléctrodo de carbono vítreo; GQD - Quantum dots de grafeno; HMDE - Eléctrodo de mercúrio; ITO - Eléctrodo de Índio; MWCNT - Nanotubos de carbono de parede múltipla; NiTsPc - Ftalocianina de níquel; PVP - Polivinilpirrolidona; rGO - Óxido de grafeno reduzido; SPCE - Eléctrodo de carbono impresso; SPE - Eléctrodo impresso; TA - Ácido tânico.

É possível verificar que diferentes tipos de eléctrodos, modificados e não modificados, foram efetivamente aplicados na deteção de etinilestradiol, nomeadamente o de mercúrio (HMDE – *hanging mercury drop electrode*) [43, 51, 56], ouro (Au) [44], índio (ITO – *indium tin oxide*) [61], flúor (FTO – *fluorine tin oxide*) [54] e os frequentemente usados à base de carbono, tal como carbono vítreo (GCE – *glassy carbon electrode*) [45, 46, 47, 49, 50, 53, 55, 58], pasta de carbono (CPE – *carbon paste electrode*) [43], diamante dopado com boro (BDD – *boron-doped diamond*) [52] e eléctrodos impressos de carbono (SPCE – *screen printed carbon electrode*) [56, 59, 60]. Contudo, não há ainda descrito

na literatura sensores para esta hormona à base de fibras de carbono. Analisando o desempenho dos sensores descritos na Tabela 1.2, observa-se no geral que os que atingem limites de deteção (LOD) mais baixos, na ordem dos subnanomolar, são aqueles designados de biossensores, integrando na sua composição entidades biológicas, tal como enzimas [49, 54] ou anticorpos [44, 50], embora a conceção específica de biossensores seja normalmente complexa e bastante dispendiosa. Por outro lado, existem também sensores à base de mercúrio que apresentam boa sensibilidade ao etinilestradiol [42, 51, 56], mas a toxicidade inerente ao mercúrio constitui um enorme problema. Do ponto de vista prático e de portabilidade, a aplicação dos elétrodos impressos, que integram na sua conceção os elétrodos auxiliar e referência, é bastante interessante embora possa apresentar sensibilidade limitada se usados sem modificação [56]. No geral, os (bio)sensores descritos para deteção de etinilestradiol são nanoestruturados de forma a aumentar o desempenho analítico, acarretando também outro nível de dificuldade na sua conceção.

## 2 Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho consistiu no desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a deteção do fármaco etinilestradiol.

O material papel de fibra de carbono (CP) foi utilizado como sensor eletroquímico sem qualquer modificação da sua superfície. Os objetivos parciais do trabalho foram os seguintes:

- ✓ Otimização e avaliação do pré-tratamento a conferir ao CP usando uma sonda eletroquímica à base de ferro (hexacianoferrato);
- ✓ Estudo do comportamento e mecanismo de reação de oxidação do fármaco etinilestradiol através da voltametria cíclica;
- ✓ Otimização das condições analíticas (pH da solução e parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV));
- ✓ Determinação da curva de calibração do etinilestradiol nas condições ótimas previamente determinadas;
- ✓ Aplicação do sensor para deteção de etinilestradiol em água.



### 3 Metodologia experimental

Neste capítulo são descritos os equipamentos, reagentes, soluções e os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

#### 3.1 Equipamento e material

Para a realização das medições voltamétricas foi utilizado um potencióstato Metrohm Autolab e para a obtenção dos dados foi utilizado um Software GPES (Eco Chimie, Países Baixos).

A configuração do sistema eletroquímico é de três elétrodos sendo o eléctrodo auxiliar de platina, o eléctrodo de referência correspondente a Ag/AgCl (3 M KCl) e o eléctrodo de trabalho correspondente ao CP (*TORAY*, Alfa Aesar, EUA). De forma a garantir uma boa ligação, uma das extremidades do CP foi revestida com papel de alumínio, como se pode verificar na Figura 3.1.



Figura 3.1 – Eléctrodo de CP revestido por papel de alumínio numa das extremidades.

Outros equipamentos foram também usados no auxílio de preparação de soluções, nomeadamente, um medidor de pH Crison micropH 2002 (Espanha) e um banho de ultrassons JP Selecta (Espanha).

#### 3.2 Reagentes e soluções

##### 3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na realização dos ensaios foram adquiridos à Merck (Alemanha): etanol absoluto ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \geq 99.5\%$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95 - 97%), ácido clorídrico (HCl, 37%) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ , 65%), acetona ( $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ ),

hexacianoferrato de potássio (II) trihidratado ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O > 99.8\%$ ), hexacianoferrato de potássio (III) ( $K_3Fe(CN)_6 > 99\%$ ), cloreto de potássio ( $KCl > 99.8\%$ ), ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ , 85% m/v em  $H_2O$ ), ácido bórico ( $H_3BO_4 \geq 99.5\%$ ), ácido acético ( $CH_3COOH > 99\%$ ), hidróxido de sódio ( $NaOH$ , 98%), fosfato dissódico ( $Na_2HPO_4$ ), fosfato monossódico ( $NaH_2PO_4$ ) e etinilestradiol ( $C_{20}H_{24}O_2 > 98\%$ ).

### 3.2.2 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada. O tampão de Britton-Robinson (BRB) 0,1 M e pH 7 foi preparado de acordo com as tabelas disponíveis na literatura [62]. A partir desta solução, o acerto de pH para diferentes valores, para o estudo de otimização de pH, foi feito através da adição de soluções 1 M de HCl ou NaOH. O tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M e pH 7 foi preparado através de mistura equimolar de  $Na_2HPO_4$  e  $NaH_2PO_4$  e usado para o estudo e determinação do fármaco etinilestradiol. Uma solução de hexacianoferrato foi preparada com concentrações iguais (5 mM) de  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  e  $K_3[Fe(CN)_6]$  em 0,1 M de KCl e usada como sonda eletroquímica para avaliar cada tipo de pré-tratamento do CP.

## 3.3 Procedimento experimental

### 3.3.1 Otimização do pré-tratamento do CP

Diferentes pré-tratamentos químicos e eletroquímicos foram aplicados, à temperatura ambiente, para limpeza e ativação do eletrodo de trabalho (CP). O pré-tratamento químico consistiu no uso de solventes orgânicos como o etanol e acetona, mas também ácidos (concentrados e diluídos) nomeadamente  $H_2SO_4$ , HCl e  $HNO_3$ . O CP foi imerso no solvente (etanol ou acetona) e levado ao banho de ultrassons durante 30 minutos. De forma a remover restos de solvente, o CP foi imerso em água em banho ultrassons durante 10 min seguido de secagem em estufa por 5 minutos. O tratamento químico do CP usando os diferentes ácidos foi feito de forma semelhante através da aplicação do banho de ultrassons e o passo de lavagem, testando também diferentes concentrações dos ácidos (sem diluição, diluídos 1:1 (v/v) e concentração 3 M). Como alternativa, a lavagem com água foi substituída por etanol ou acetona no caso do tratamento do CP com ácidos diluídos 1:1 (v/v) e concentração 3 M, sendo finalmente secos na estufa por 5 minutos.

O pré-tratamento eletroquímico consistiu na aplicação de voltametria cíclica ao CP através de 50 varrimentos de - 0,2 a 1 V com uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s, usando como eletrólito o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com 3 concentrações diferentes (0,1, 0,5 e 1 M).

Por último, conjugaram-se os pré-tratamentos químicos e eletroquímicos. Este pré-tratamento consistiu primeiro na aplicação do tratamento químico com etanol ou ácidos 1 M com recurso ao banho de ultrassons, seguido do procedimento eletroquímico usando o ácido como eletrólito na concentração 1 M.

Todos os tipos e variações de pré-tratamentos conferidos ao CP foram avaliados e comparados por voltametria cíclica usando como eletrólito 10 mL de uma solução equimolar de hexacianoferrato em 0,1 M KCl, varrendo o potencial de 0,2 a 0,8 V (3 varrimentos) a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s.

### 3.3.2 Estudo do comportamento eletroquímico do etinilestradiol

Para avaliação do comportamento do etinilestradiol foi realizado um ensaio por DPV com CP sem pré-tratamento e outro com CP pré-tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e electroquimicamente, numa solução de 0,300 µM de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: tempo de modelação = 0,005 s, intervalo de tempo = 0,2 s, degrau de potencial = 0,01 V e amplitude de modelação = 0,07 V.

O comportamento eletroquímico do etinilestradiol foi também caracterizado por CV realizando 10 varrimentos consecutivos de 0 a 1,2 V com uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s numa solução de 1,00 µM de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. O estudo da velocidade de varrimento ocorreu de forma semelhante, mas para diferentes velocidades, nomeadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,07, 0,09, 0,1, 0,12, 0,14, 0,15, 0,2 V/s para uma concentração de solução de etinilestradiol de 10,0 µM em 0,1 M PBS pH 7.

### 3.3.3 Otimização das condições analíticas e determinação de etinilestradiol

Para as subsequentes experiências foi aplicada a técnica eletroquímica DPV por ser uma técnica altamente sensível na determinação de baixas concentrações de analito.

Na otimização do pH foram testados diferentes valores, nomeadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 usando como eletrólito a solução tampão BRB 0,1 M contendo uma concentração de etinilestradiol de 1,00 µM. Neste estudo varreu-se o potencial de 0 a 0,9

V e os parâmetros DPV usados foram os seguintes: tempo de modelação de 0,005 s; intervalo de tempo de 0,2 s; degrau de potencial de 0,01 V e modelação da amplitude de 0,04 V.

Em seguida, foi realizada a otimização dos parâmetros DPV usando eletrólito PBS com o pH ótimo de 7. Iniciou-se por variar a amplitude de modulação (0,01, 0,03, 0,05, 0,07, 0,09, 0,11, 0,13, 0,15, 0,17, 0,19, 0,2 V) mantendo os restantes parâmetros fixos, seguido da variação do tempo de modelação (0,003, 0,005, 0,007, 0,009, 0,011, 0,015, 0,020, 0,025, 0,030 s), tempo de intervalo (2, 1, 0,5, 0,33, 0,25, 0,2, 0,143, 0,111, 0,1 s) e por fim o degrau de potencial (0,0005, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,007, 0,009, 0,01, 0,0125, 0,015 V). Para finalizar, otimizou-se os parâmetros de deposição de analito, designadamente, potencial de deposição e o tempo de deposição utilizando as condições ótimas de pH e parâmetros DPV. Testaram-se primeiro diferentes tempos de deposição (0, 60, 120, 180, 240 s) a um potencial de 0 V seguido da variação do potencial de deposição (0, 0,2 e 0,4 V) realizado com o tempo de deposição ótimo.

A curva de calibração correspondente à determinação do etinilestradiol realizou-se nas condições ótimas de pH, parâmetros DPV e deposição de analito, através da adição de diferentes tomas de solução padrão etinilestradiol (de concentração 50,0, 0,500 ou 0,0100  $\mu\text{M}$ ) em 10 mL de solução tampão PBS 0,1 M e pH 7 sem etinilestradiol (branco).

Nos ensaios de otimização, para cada valor foi usado um CP novo sem pré-tratamento. Antes de cada medição foi analisado 3 vezes o branco (solução tampão sem etinilestradiol).

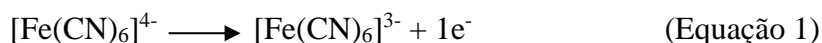
### 3.3.4 Aplicação real do sensor - análise de uma amostra de água residual

Uma amostra de água de rio obtida na saída de uma estação de tratamento de águas foi usada para validação do sensor. Cerca de 10 mL de uma mistura de 15 mL de amostra e 7,5 mL de solução PBS 0,3 M e pH 7 foram usados para o ensaio, procedendo-se à fortificação com diferentes tomas de solução padrão de etinilestradiol obtendo-se assim diferentes concentrações correspondentes a 0,00100, 0,00500, 0,0100, 0,0500, 0,100 e 1,00  $\mu\text{M}$ .

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Otimização do pré-tratamento a conferir ao CP

O trabalho experimental iniciou-se com a otimização do pré-tratamento do CP. Neste tipo de materiais à base de carbono, o pré-tratamento poderá ser essencial para remover impurezas resultantes do processo de fabrico, tornando assim o elétrodo mais eficiente na transferência de eletrões. Assim, diferentes tipos de pré-tratamentos (que são normalmente empregues em estudos da literatura) foram testados, sendo eles químicos (solventes orgânicos e ácidos), eletroquímicos (voltametria em ácido) ou uma combinação dos dois. A avaliação eletroquímica do pré-tratamento foi feita através da técnica de voltametria cíclica utilizando como solução uma sonda de oxidação-redução à base de ferro (hexacianoferrato). Esta solução de hexacianoferrato é electroquimicamente reversível, envolvendo a transferência de 1 eletrão. As equações 1 e 2 demonstram o comportamento redox do hexacianoferrato com a aplicação da voltametria cíclica.



É expectável que o pré-tratamento melhore a intensidade e definição dos picos de oxidação e redução da sonda, assim como, diminua o afastamento entre esses picos (maior taxa de transferência de eletrões). Na Figura 4.1 encontram-se apresentados os voltamogramas cíclicos dos melhores pré-tratamentos, enquanto que, no Anexo A.1 cada tipo de pré-tratamento é analisado individualmente.

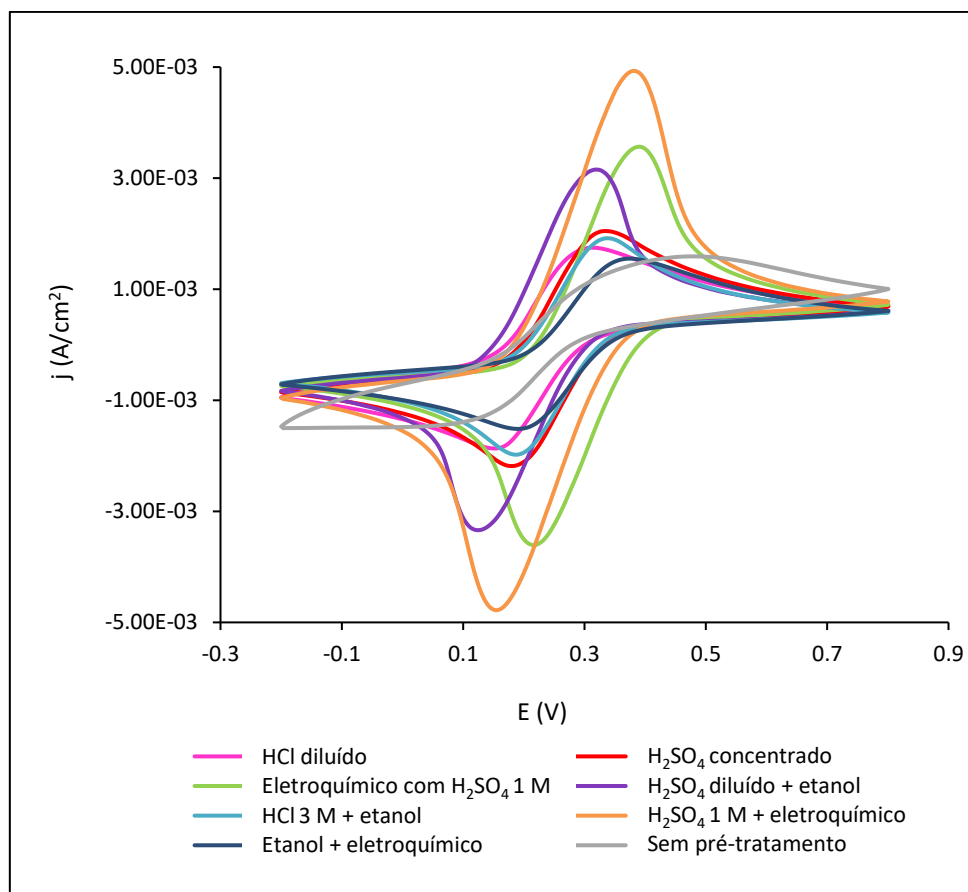


Figura 4.1 – Voltamogramas cíclicos dos melhores pré-tratamentos.

Analisando a Figura 4.1, a aplicação de pré-tratamento ao CP beneficia o sinal eletroquímico da sonda de hexacianoferrato quando comparado com CP sem pré-tratamento, dado que a intensidade dos picos de oxidação-redução é maior e o distanciamento entre eles é menor. Numa análise concreta aos vários tipos de pré-tratamento, verifica-se que a intensidade dos picos de oxidação e redução do hexacianoferrato parece ser maior nos tratamentos eletroquímicos do CP. Para clarificar melhor esta comparação, foram determinadas as intensidades dos picos anódicos ( $I_{pa}$ ) e catódicos ( $I_{pc}$ ), a fim de possibilitar o cálculo da razão entre as intensidades de pico ( $I_{pc}/I_{pa}$ ), e a variação do potencial entre o pico anódico e o pico catódico ( $\Delta E_p$ ), sendo estes dados apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Parâmetros para avaliação de uma reação reversível por voltametria cíclica.

<b>Eléctrodo</b>	<b>I<sub>pc</sub></b> <b>(A/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>I<sub>pa</sub></b> <b>(A/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>I<sub>pc</sub>/I<sub>pa</sub></b>	<b>ΔE<sub>p</sub></b> <b>(V)</b>
<b>HCl diluído</b>	0,00186	0,00203	0,916	0,154
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado</b>	0,00233	0,00245	0,954	0,155
<b>Eletroquímico com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M</b>	0,00387	0,00388	0,997	0,172
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído e etanol</b>	0,00340	0,00353	0,964	0,203
<b>HCl 3 M e etanol</b>	0,00215	0,00222	0,969	0,154
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e electroquímico</b>	0,00522	0,00516	1,01	0,227
<b>Etanol e electroquímico</b>	0,00169	0,00170	0,989	0,184

Efetivamente, o pré-tratamento do CP (primeiro em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M em banho de ultrassons seguido do procedimento electroquímico também em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) apresenta maior intensidade de corrente de ambos os picos, comparativamente aos restantes pré-tratamentos. Apresentou também uma boa reversibilidade (1,01) embora o distanciamento entre picos também tenha aumentado (0,227 V), consequência do aumento da intensidade dos picos.

Todos os eléctrodos de trabalho, à excepção do eléctrodo pré-tratado em HCl diluído, apresentaram uma razão entre intensidades de pico anódica e catódica (I<sub>pc</sub>/I<sub>pa</sub>) próxima de 1,0, mostrando um bom desempenho analítico para um sistema de oxidação-redução reversível.

Como a reação de oxidação-redução do hexacianoferrato envolve a transferência de 1 electrão, uma medição perfeita da variação entre os potenciais anódico e catódico resultaria num valor teórico de 0,059 V [63]. Assim, quanto mais afastado o valor obtido for do valor teórico, maior o afastamento da reversibilidade. Concluiu-se então que os eléctrodos pré-tratados analisam a solução de hexacianoferrato como um processo quase-reversível. É de salientar que a combinação entre tratamento químico com ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) e electroquímico conferido ao eléctrodo apresentou melhor desempenho na detecção do hexacianoferrato em termos de intensidade de picos, por isso, este tipo de pré-tratamento dado ao CP foi equacionado para os ensaios de detecção do fármaco etinilestradiol.

## 4.2 Estudo do comportamento eletroquímico do etinilestradiol

O estudo do comportamento eletroquímico do fármaco etinilestradiol foi efetuado tanto por voltametria cíclica como por DPV. Nesta última técnica, para a determinação de eventuais picos do etinilestradiol foi usado um CP com o pré-tratamento ótimo determinado na secção anterior e um CP sem pré-tratamento estando o resultado visível na Figura 4.2. Em ambos os sensores observou-se um pico de oxidação do fármaco tal como indicado em estudos da literatura [43, 55].

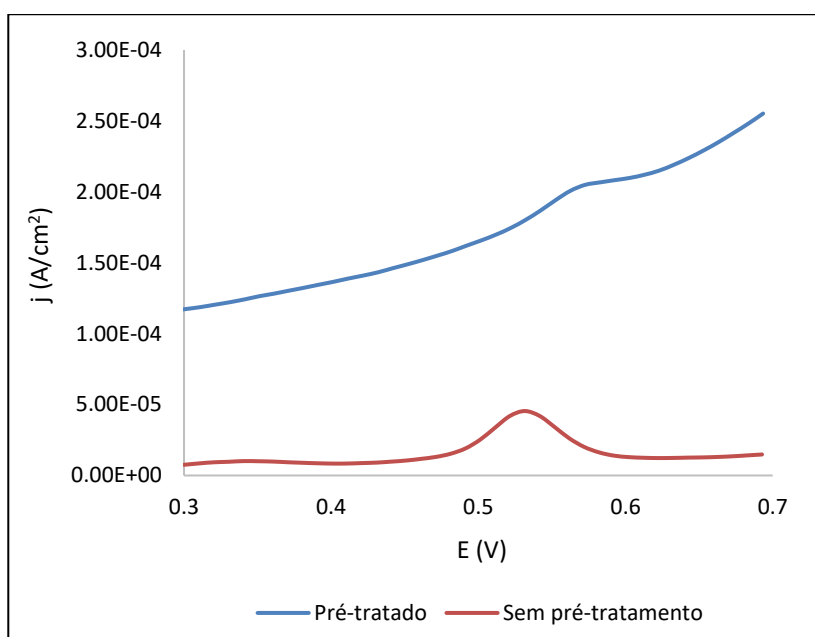


Figura 4.2 – Comportamento do etinilestradiol por DPV com CP sem pré-tratamento e com CP pré-tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e electroquimicamente. As medições foram realizadas com 0,300 μM de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Parâmetros de DPV: tempo de modelação = 0,005 s, intervalo de tempo = 0,2 s, degrau de potencial = 0,01 V e amplitude de modelação = 0,07 V.

Contudo, e surpreendentemente, verifica-se que o eléctrodo sem pré-tratamento apresenta maior intensidade e definição do pico de oxidação, sendo assim, todos os ensaios referentes à determinação deste fármaco foram realizados com CP sem pré-tratamento, o que torna os ensaios mais simples e rápidos.

Por CV e numa janela de potencial mais alargada, confirmou-se apenas a existência de um pico referente à oxidação do fármaco (Figura 4.3).

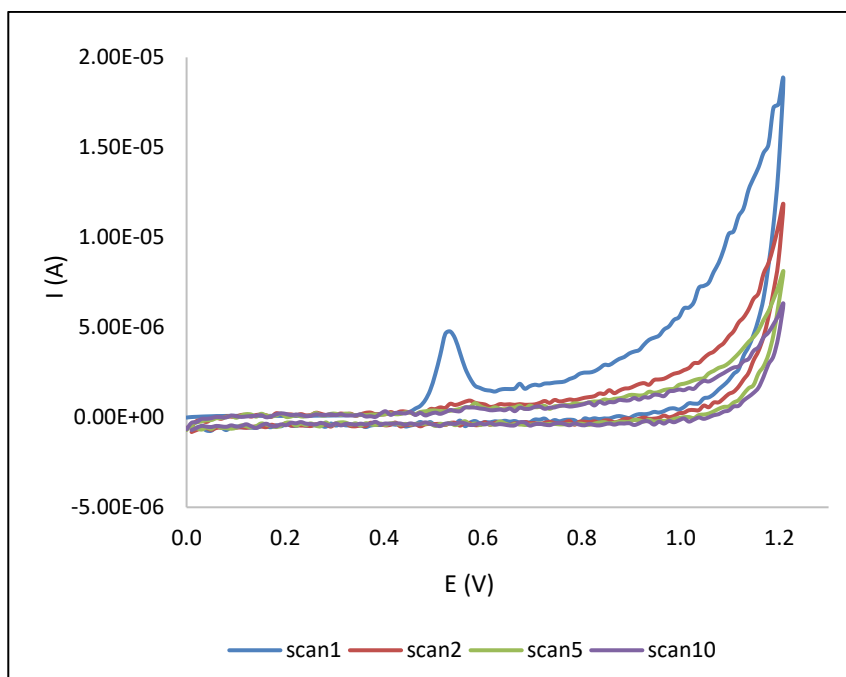


Figura 4.3 – Comportamento do etinilestradiol por voltametria cíclica. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Parâmetro de CV: velocidade de varrimento = 0,1 V/s.

Este pico apresenta-se a um potencial aproximado de + 0,53 V e, como esperado, a intensidade do pico esbate-se significativamente após o primeiro varrimento, possivelmente devido ao lento mecanismo de difusão de etinilestradiol da solução para a superfície do sensor ou devido à passivação do eléctrodo com os produtos da oxidação.

À medida que o potencial se desloca para valores mais positivos e superiores ocorrem efeitos de electrólise da água, originando o aumento da corrente. Para valores próximos de 0 V não se verifica qualquer efeito porque a corrente é praticamente constante e também muito baixa.

Em seguida realizou-se um estudo de variação da velocidade de varrimento (de 0,01 a 0,2 V/s), por CV, de forma a compreender melhor o mecanismo que envolve a oxidação do etinilestradiol pelo CP, estando os resultados presentes na Figura 4.4. No estudo da velocidade de varrimento obteve-se o sinal de intensidade de corrente do pico em função da velocidade de varrimento, como pode ser observado na Figura 4.4a.

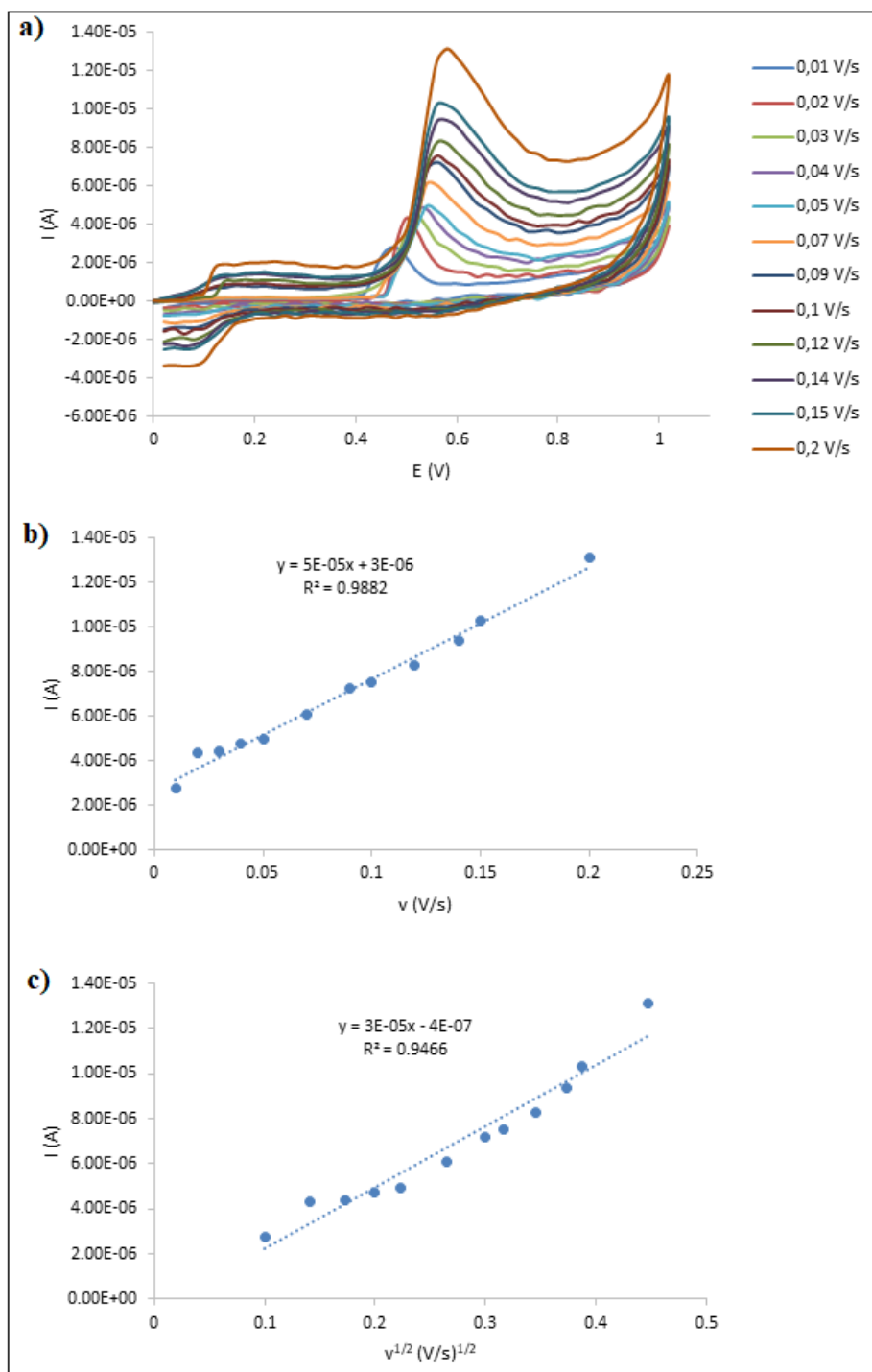


Figura 4.4 – a) Voltamogramas cíclicos obtidos para otimização da velocidade de varrimento. b) Intensidade da corrente do pico (A) em função da velocidade de varrimento (V/s). c) Intensidade da corrente (A) em função da velocidade de varrimento<sup>1/2</sup> ((V/s)<sup>1/2</sup>). As medições foram realizadas com 10,0  $\mu$ M de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7.

A intensidade do pico aumentou com a velocidade de varrimento, deslocando-se para valores mais positivos o que indica que a reação é irreversível (Figura 4.4a). Verifica-se

uma maior linearidade quando a intensidade da corrente se relaciona diretamente com a velocidade de varrimento ( $v$ ) (Figura 4.4b) quando comparado com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ( $v^{1/2}$ ) (Figura 4.4 c), concluindo-se que a reação é controlada por adsorção e não por difusão [64].

### 4.3 Otimização das condições analíticas e determinação de etinilestradiol

A técnica eletroquímica de DPV foi escolhida para a determinação de etinilestradiol devido à sua alta sensibilidade e capacidade de discriminação quando comparada com a CV. As condições de análise foram primeiramente otimizadas, nomeadamente o pH do eletrólito e os parâmetros da técnica DPV com finalidade de determinar as melhores condições experimentais para realização da calibração do etinilestradiol.

O pH é um fator muito importante, uma vez que para diferentes valores de pH o pico de oxidação/redução de um composto pode sofrer alterações. Na Figura 4.5a encontram-se os voltamogramas obtidos para os diferentes valores de pH, a intensidade do pico em função do pH (Figura 4.5b), assim como o potencial do pico em função do pH (Figura 4.5c).

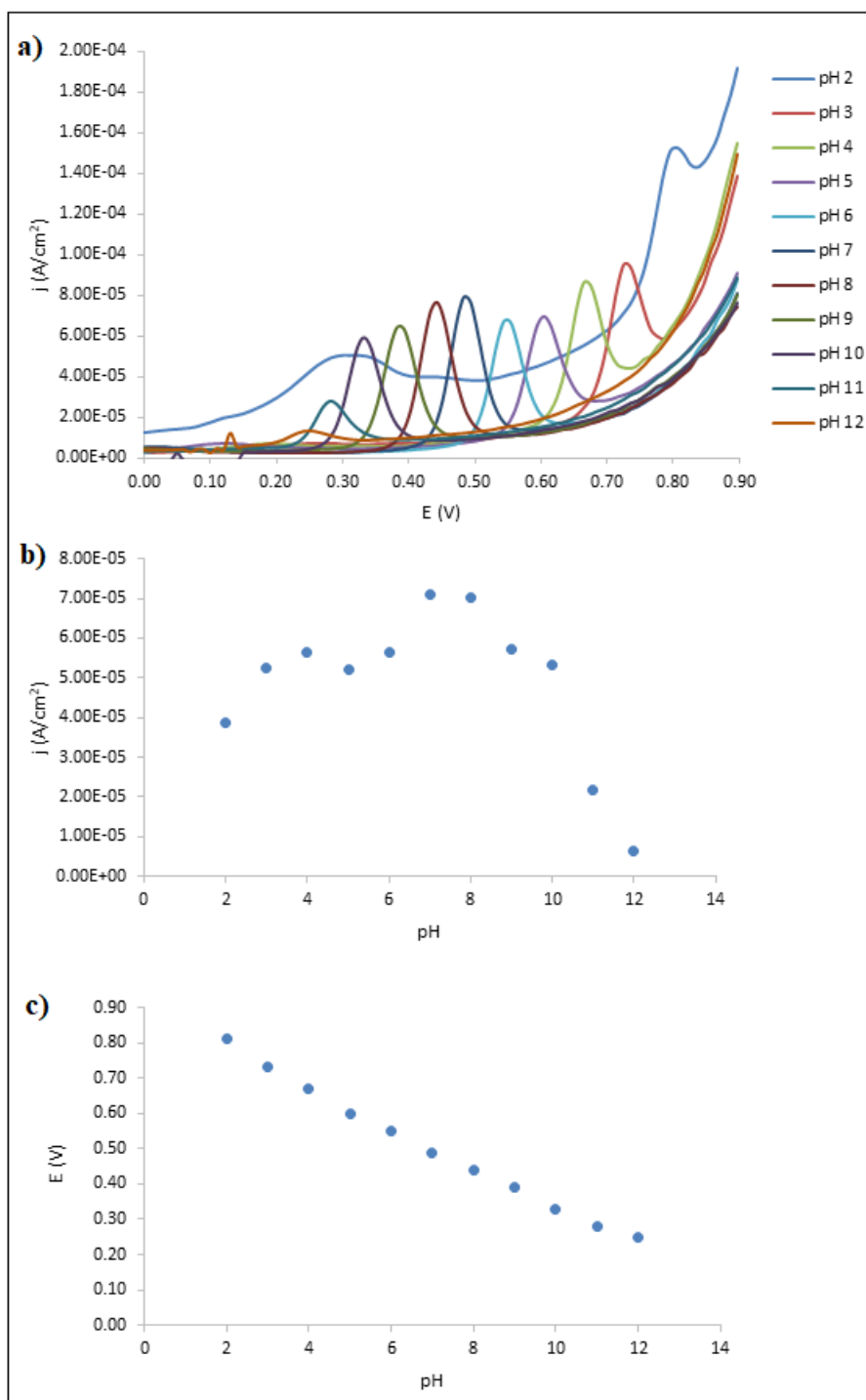


Figura 4.5 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização do pH. b) Intensidade da corrente em função do pH. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu$ M de etinilestradiol em 0,1 M BRB. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: tempo de modelação = 0,005 s; intervalo de tempo = 0,2 s; degrau de potencial = 0,01 V e modulação da amplitude = 0,04 V.

Ao analisar os voltamogramas da Figura 4.5, observa-se que tanto a intensidade do pico como o potencial do pico são dependentes do pH, uma vez que o potencial se desloca para valores menores com o aumento do pH. A solução com pH 7 apresenta uma maior intensidade do pico em comparação com os restantes valores de pH, de acordo com a Figura 4.5b, sendo então escolhido como pH ótimo para a determinação de etinilestradiol.

Após otimização do pH do eletrólito foram otimizados os parâmetros da técnica DPV, nomeadamente a amplitude de modulação, tempo de modulação, intervalo de tempo e degrau de potencial. A relação entre o valor de intensidade de corrente do pico e a amplitude de modulação pode ser observada na Figura 4.6.

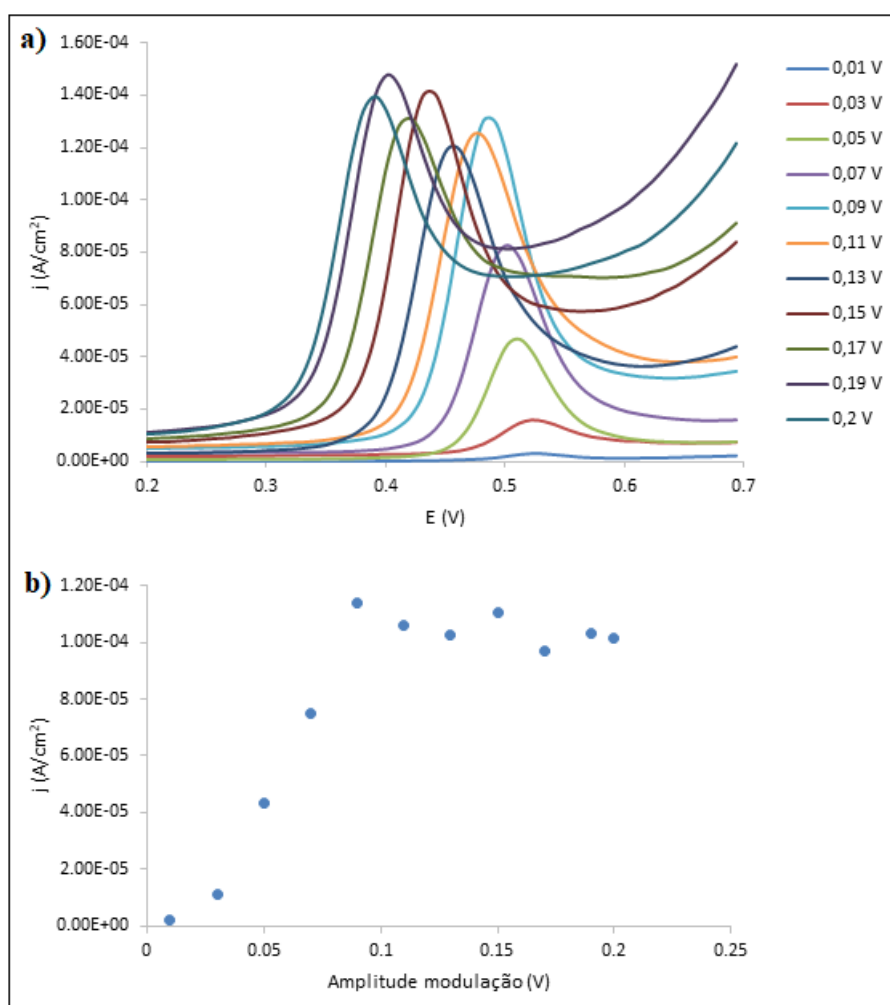


Figura 4.6 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização da amplitude de modulação. b) Intensidade da corrente do pico em função da amplitude de modulação. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu$ M de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: degrau de potencial = 0,010 V, tempo de intervalo = 0,2 s e tempo de modulação = 0,005 s.

Através da análise dos voltamogramas da Figura 4.6a observa-se que com o aumento da amplitude de modulação o pico desloca-se tendencialmente para o valor de potencial zero. Relativamente à intensidade da corrente, verifica-se um aumento da intensidade da corrente do pico até 0,09 V e posteriormente ocorre uma ligeira diminuição até 0,2 V. Pode-se, assim, concluir que o valor mais indicado para subseqüentes otimizações é 0,09 V.

Na avaliação do tempo de modulação, demonstrada na Figura 4.7, verificou-se por sua vez que o valor mais baixo (0,003 s) foi o que correspondeu a uma maior intensidade do pico do etinilestradiol, decrescendo sempre à medida que se aumentava o tempo de modulação (Figura 4.7b). Assim o valor 0,003 s foi considerado ótimo e utilizado nas seguintes otimizações.

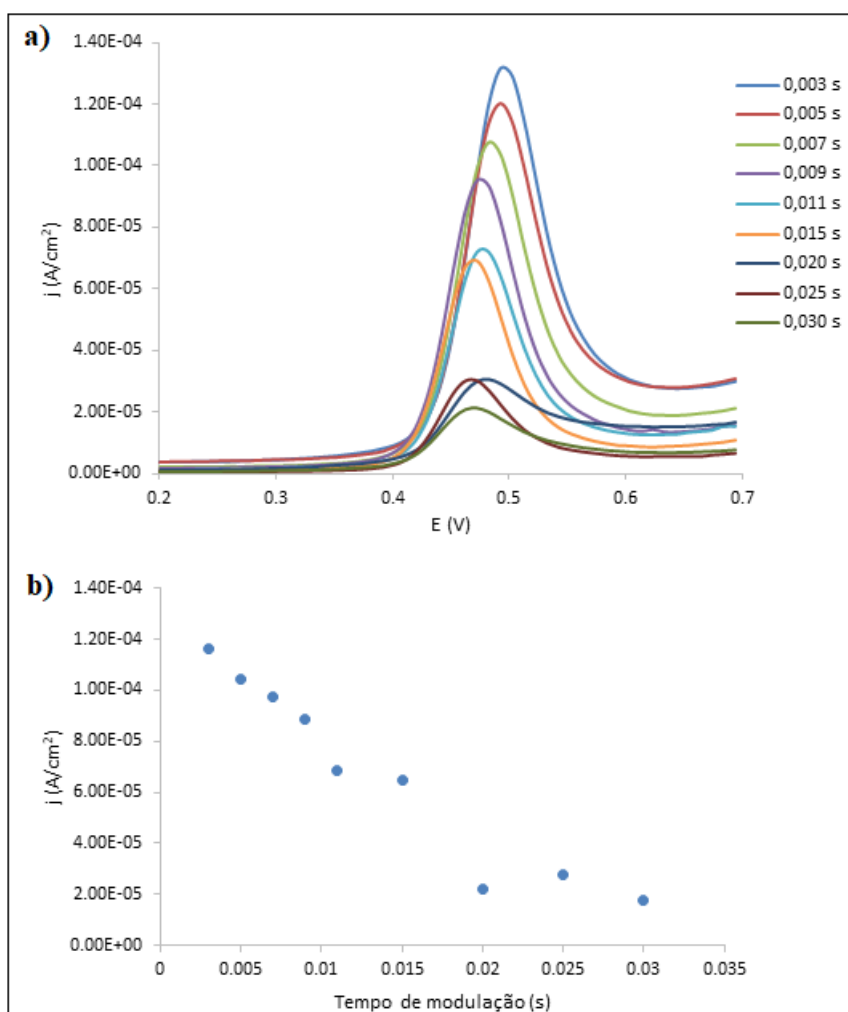


Figura 4.7 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização do tempo de modulação. b) Intensidade da corrente em função do tempo de modulação. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu$ M de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: degrau de potencial = 0,01 V, tempo de intervalo = 0,2 s e amplitude de modulação = 0,09 V.

Os seguintes parâmetros, nomeadamente intervalo de tempo e degrau de potencial dizem respeito à velocidade de varrimento da técnica (divisão entre o segundo pelo primeiro). Determinou-se primeiro o valor ótimo do intervalo de tempo mantendo o degrau de potencial constante e correspondente a 0,01 V, estando os resultados apresentados na Figura 4.8.

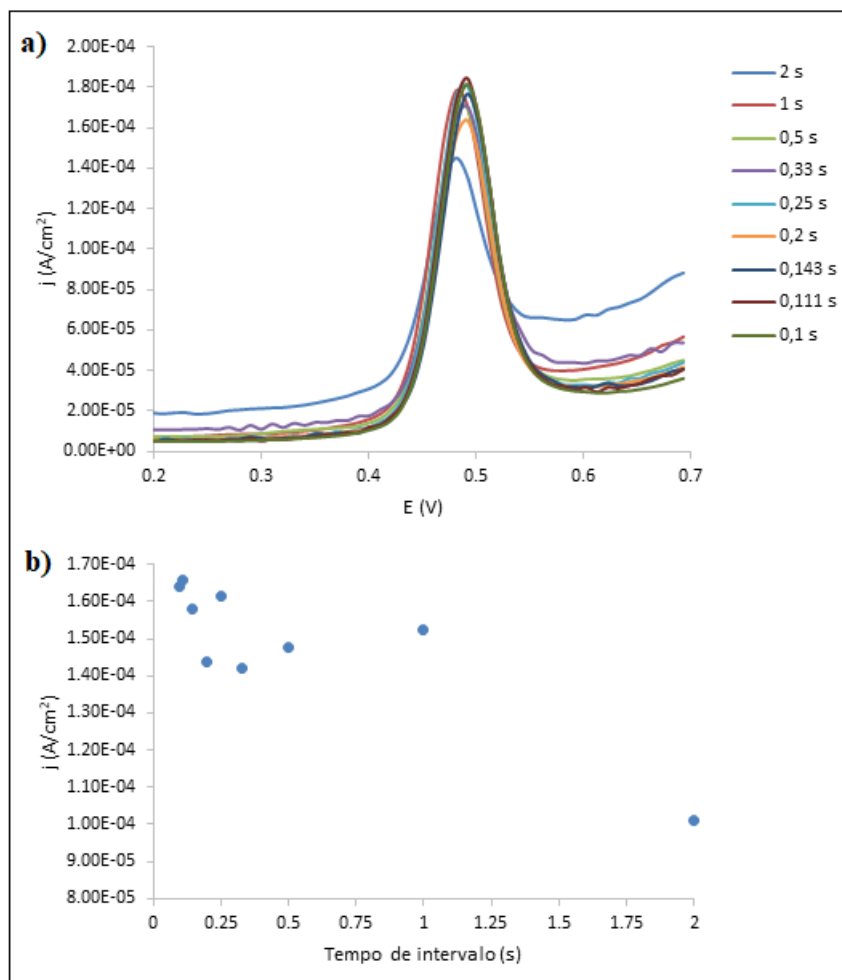


Figura 4.8 – a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para otimização do tempo de intervalo. b) Intensidade da corrente em função do tempo de intervalo. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu\text{M}$  de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: degrau de potencial = 0,01 V, tempo de modulação = 0,003 s e amplitude de modulação = 0,09 V.

Ao analisar os voltamogramas da Figura 4.8, observa-se que o potencial do pico praticamente não se altera com a diminuição do tempo de intervalo. Relativamente à intensidade da corrente, verifica-se que varia com a alteração do tempo de intervalo e é possível observar que o valor de 0,1 s é o que apresenta uma intensidade da corrente mais elevada, sendo o valor selecionado para a otimização do degrau de potencial.

Por fim, este último parâmetro foi analisado usando os valores ótimos dos parâmetros anteriores (tempo de intervalo = 0,1 s, tempo de modulação = 0,003 s e amplitude de modulação = 0,09 V), com os resultados a serem apresentados na Figura 4.9.

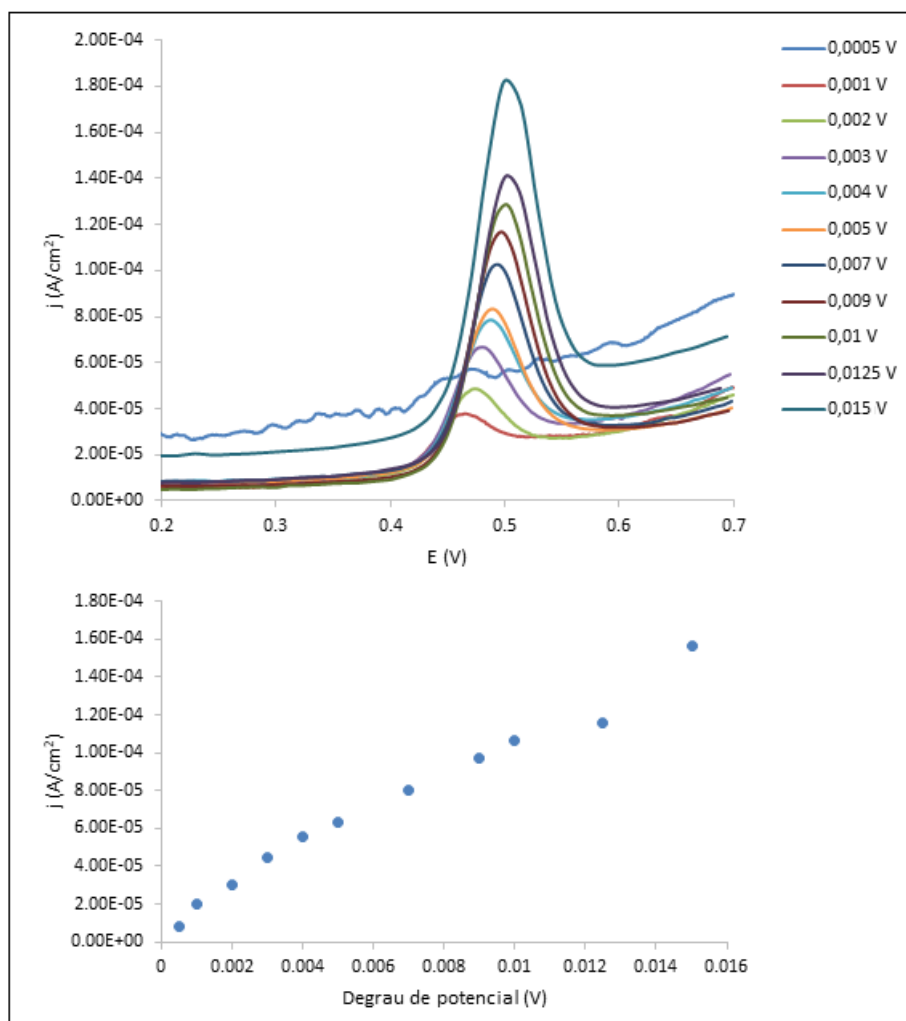


Figura 4.9 – a) Voltamogramas obtidos para análise do degrau de potencial. b) Intensidade da corrente em função do degrau de potencial. As medições foram realizadas com 1,00  $\mu$ M de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7. Os parâmetros DPV usados foram os seguintes: tempo de intervalo = 0,1 s, tempo de modulação = 0,003 s e amplitude de modulação = 0,09 V.

Através da Figura 4.9, observa-se que ocorre um aumento gradual da intensidade do pico e um deslocamento do potencial ligeiramente para valores mais positivos com o aumento do degrau de potencial. Apesar do pico ser maior para o um valor 0,015 V, selecionou-se um valor de 0,01 V, correspondente a um varrimento de 100 mV/s, por apresentar uma maior estabilidade e reprodutibilidade nos resultados obtidos.

Por último, e finalizada a otimização dos parâmetros DPV, procedeu-se à otimização da deposição eletroquímica de etinilestradiol à superfície do sensor, através da variação do potencial de deposição e do tempo de deposição. O tempo de deposição foi estudado com

um potencial de deposição de 0 V. Os resultados obtidos para esta variação encontram-se apresentados na Figura 4.10.

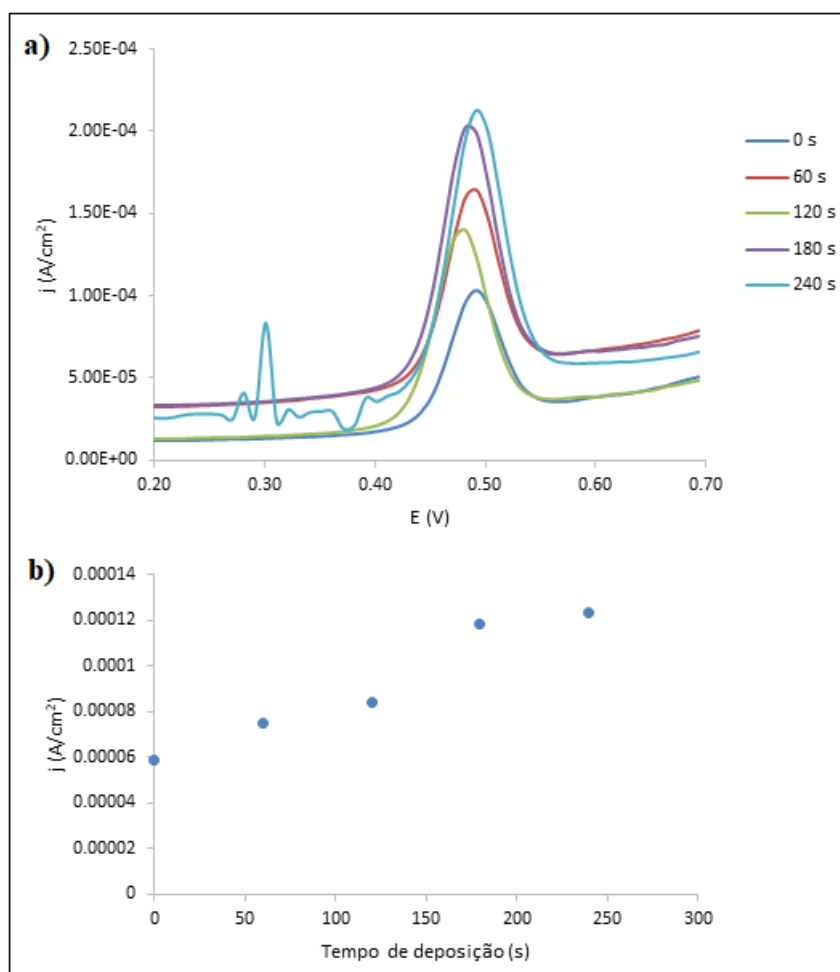


Figura 4.10 – a) Voltamogramas obtidos para análise do tempo de deposição. b) Intensidade da corrente em função do tempo de deposição. As medições foram realizadas com 0,500  $\mu$ M de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7 utilizando as condições ótimas de pH e parâmetros DPV e um potencial de deposição = 0 V.

Como pode ser observado e como expectável, um maior tempo de deposição origina um maior pico de deteção do composto. Apesar da intensidade de sinal ser ligeiramente superior para 240 s, optou-se por definir como ótimo o tempo de 180 s uma vez que encurtará o tempo de análise.

Utilizando o valor de 180 s como tempo de deposição, procedeu-se à variação do potencial de deposição selecionando-se para análise dois potenciais diferentes (0,2 e 0,4 V), com os resultados obtidos a serem apresentados na Figura 4.11.

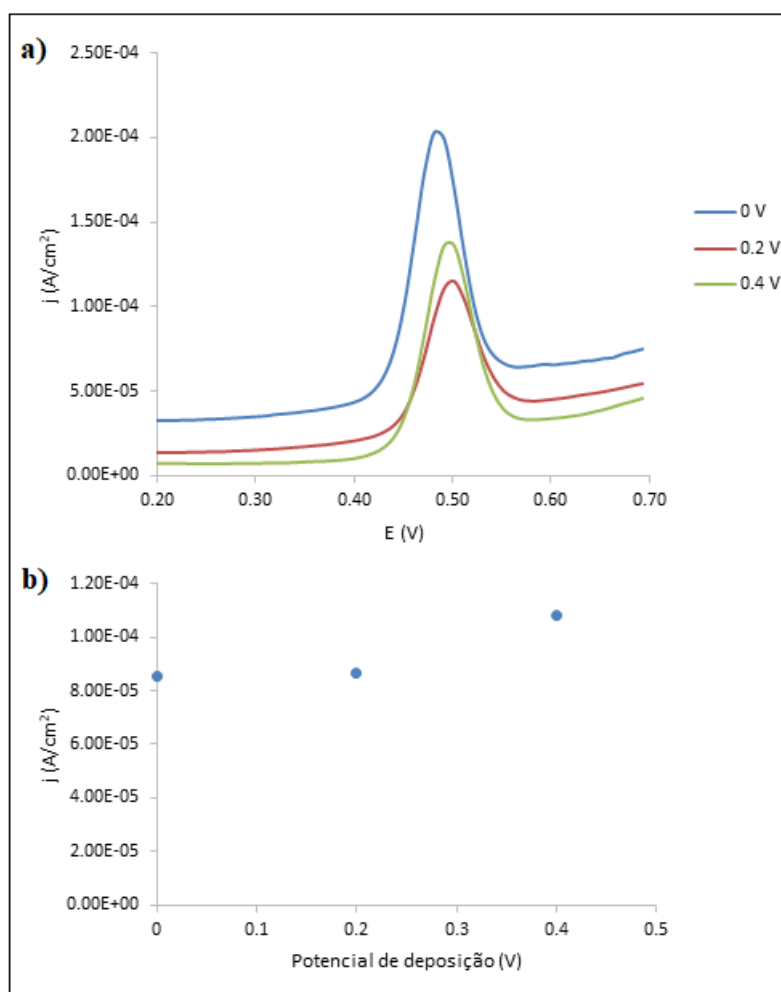


Figura 4.11 – Voltamogramas obtidos para análise do potencial de deposição. b) Intensidade da corrente em função do potencial de deposição. As medições foram realizadas com 0,500  $\mu$ M de etinilestradiol em 0,1 M PBS pH 7 utilizando as condições ótimas de pH e parâmetros DPV e um tempo de deposição = 180 s.

Através da Figura 4.11, verifica-se que o potencial de deposição 0,4 V foi o que apresentou maiores valores para este parâmetro, e, por isso, foi o valor escolhido para as restantes análises, ficando assim concluído o processo de otimização do sensor eletroquímico.

Concluído o processo de otimização do sensor eletroquímico realizaram-se em seguida ensaios de determinação de etinilestradiol em concentrações crescentes nas condições ótimas obtidas anteriormente. Alíquotas de solução padrão de etinilestradiol foram adicionadas ao eletrólito inicialmente sem fármaco, analisando-se numa gama de concentrações de 0,000100 a 6,00  $\mu$ M ( $n = 3$  para cada concentração). A determinação

voltamétrica e a média das curvas de calibração obtidas na gama de concentrações estudada estão apresentadas na Figura 4.12.

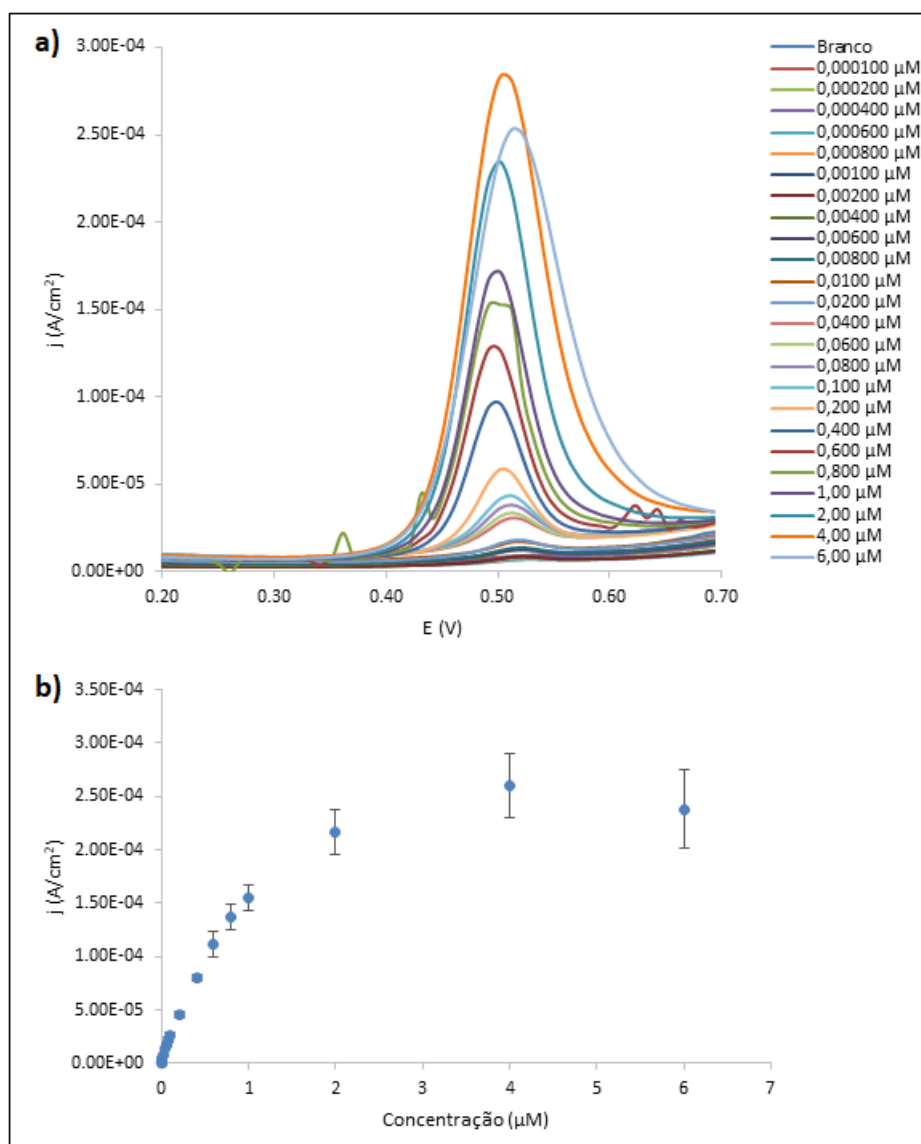


Figura 4.12 – Determinação de etinilestradiol por DPV nas condições ótimas (pH do eletrólito = 7; modulação da amplitude = 0,09 V; tempo de modulação = 0,003 s; intervalo de tempo = 0,1 s; degrau de potencial = 0,01 V; tempo de deposição = 180 s; potencial de deposição = 0,4 V). a) Voltamogramas obtidos na análise de concentrações crescentes de etinilestradiol. b) Curva de calibração na gama de 0,000100 – 6,00 μM de etinilestradiol.

Através da curva de calibração apresentada na Figura 4.12b é possível observar que o pico do etinilestradiol aumenta até 4,00 μM, atingindo assim a saturação nesta zona. Nesta ampla gama de concentrações é difícil constatar a existência de diferentes zonas de

linearidade. Por esse motivo esta curva foi dividida em 4 curvas de calibração que correspondem às diferentes zonas de linearidade, que se apresentam na Figura 4.13.

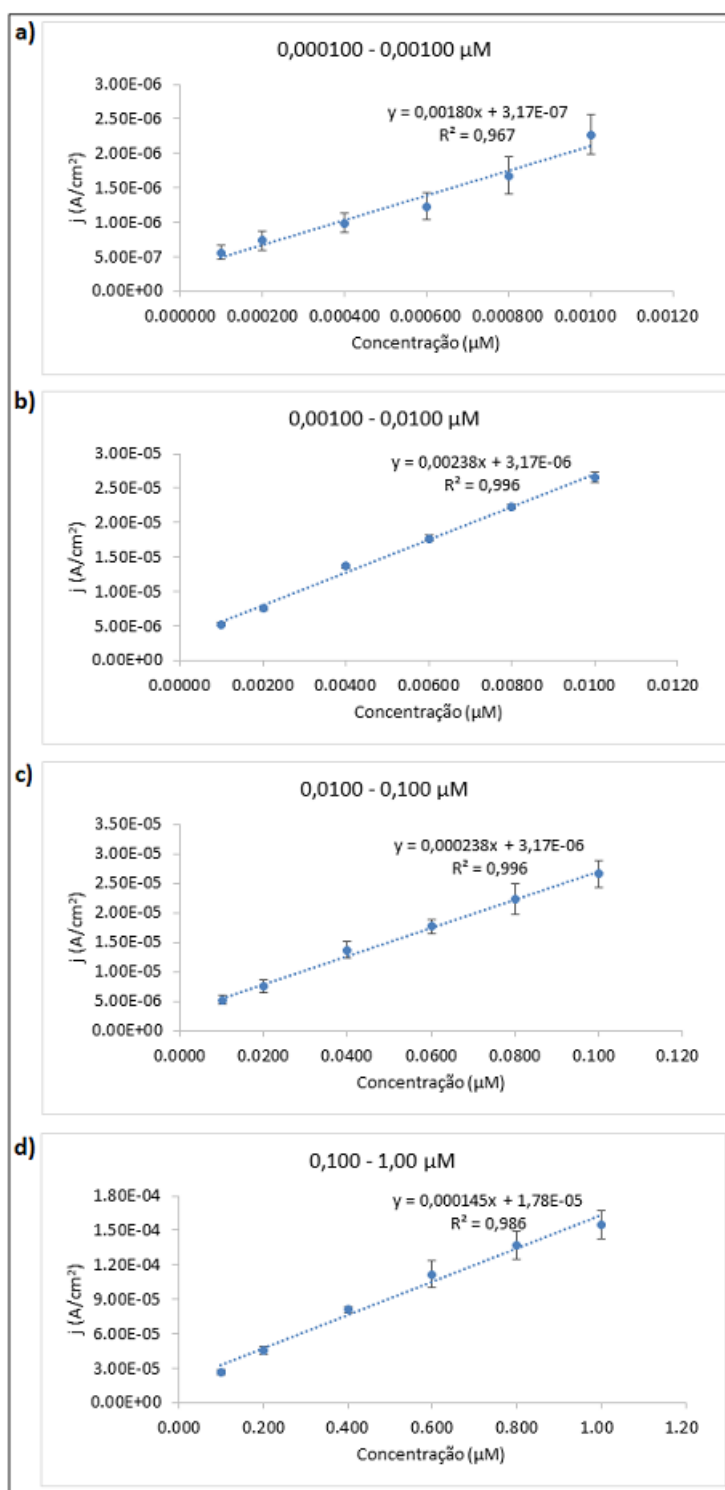


Figura 4.13 – Curvas de calibração correspondentes às diferentes zonas de linearidade. a) 0,000100 – 0,00100 μM. b) 0,00100 – 0,0100 μM. c) 0,0100 – 0,100 μM. d) 0,100 – 1,00 μM.

Assim, o sensor CP permite a determinação de etinilestradiol de 0,000100 a 1,00  $\mu\text{M}$  obtendo-se diferentes sensibilidades consoante a zona linear (equivalente ao declive da reta). De 0,000100 a 0,00100  $\mu\text{M}$  a sensibilidade corresponde a 0,00180  $\text{A}/(\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2)$ , de 0,00100 a 0,0100  $\mu\text{M}$  corresponde a 0,00238  $\text{A}/(\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2)$ , de 0,0100 a 0,100  $\mu\text{M}$  corresponde a 0,000238  $\text{A}/(\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2)$  e de 0,100 a 1,00  $\mu\text{M}$  corresponde a 0,000145  $\text{A}/(\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2)$ . A determinação do limite de deteção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) para cada zona linear foi efetuada com base no desvio padrão (SD; equação 3-5) da ordenada na origem e no declive da reta (m; equação 3-5) de acordo com as respetivas equações 3 e 4, em que o desvio padrão da ordenada na origem (SD, equação 5) é calculado com base na determinação do desvio padrão da regressão linear ( $S_{y/x}$ , equação 6):

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \text{SD}}{m} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{m} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{SD} = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \times \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Equação 6})$$

O LOD representa o teor mínimo medido a partir do qual é possível determinar a presença de um determinado analito, sem existir certeza estatística suficiente para se poder quantificar com exatidão. O LOQ é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis. A Tabela 4.2 apresenta o resumo das figuras de mérito do CP para a determinação de etinilestradiol nas condições ótimas.

Tabela 4.2 – Resultados associados à calibração do etinilestradiol.

<b>Zona de Linearidade (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Sensibilidade (<math>\text{A}/(\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2)</math>)</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>0,000100 – 0,00100</b>	0,00180	0,00045	0,0014
<b>0,00100 – 0,0100</b>	0,00238	0,00019	0,00058
<b>0,0100 – 0,100</b>	0,000238	0,016	0,048
<b>0,100 – 1,00</b>	0,000145	0,29	0,88

Apesar de se ter obtido sinal para concentrações tão baixas como 0,000100  $\mu\text{M}$ , o LOD nesta zona linear foi de 0,00045  $\mu\text{M}$ , o que pode ser explicado pelo baixo valor de correlação ( $R^2$ ) obtido na regressão linear, correspondendo a 0,967.

Comparativamente aos limites de deteção dos sensores eletroquímicos utilizados na deteção de etinilestradiol apresentados na Tabela 4.2, é possível verificar que o elétrodo de CP desenvolvido apresenta melhores resultados que o sensor HMDE [42] para a zona de linearidade 0,00190 – 0,0100  $\mu\text{M}$ , que os sensores CPE [43] e FTO/Chit/CNT [48] para a zona de linearidade 0,0500 – 0,100  $\mu\text{M}$ , que o imunossensor GCE/AgNPs-SiO<sub>2</sub>-GO/ABA-NaNO<sub>2</sub>/EDC-NHS/Ab/HRP-EE2 [50] para a zona de linearidade 0,00100 – 0,0100  $\mu\text{M}$ , que o sensor HMDE [51] para as zonas de linearidade 0,000100 – 0,00100  $\mu\text{M}$  e 0,00100 – 0,0100  $\mu\text{M}$ , que o sensor HMDE [56] para as zonas de linearidade 0,000100 – 0,00100  $\mu\text{M}$ , 0,00100 – 0,0100  $\mu\text{M}$  e 0,0100 – 0,100  $\mu\text{M}$  e que os sensores SPCE e SPCE(CNT) [56] para as zonas de linearidade 0,000100 – 0,00100  $\mu\text{M}$ , 0,00100 – 0,0100  $\mu\text{M}$ , 0,0100 – 0,100  $\mu\text{M}$  e 0,100 – 1,00  $\mu\text{M}$ .

#### 4.4 Aplicação real do sensor - análise de uma amostra de água de rio

Após obtenção da curva de calibração, o sensor foi finalmente validado numa amostra real, neste caso concreto numa amostra de água de rio recolhida após a descarga de efluente de uma estação de tratamento de águas residuais. Os resultados da água analisada diretamente com o sensor e após fortificação com 6 concentrações diferentes de etinilestradiol encontram-se apresentados na Figura 4.14.

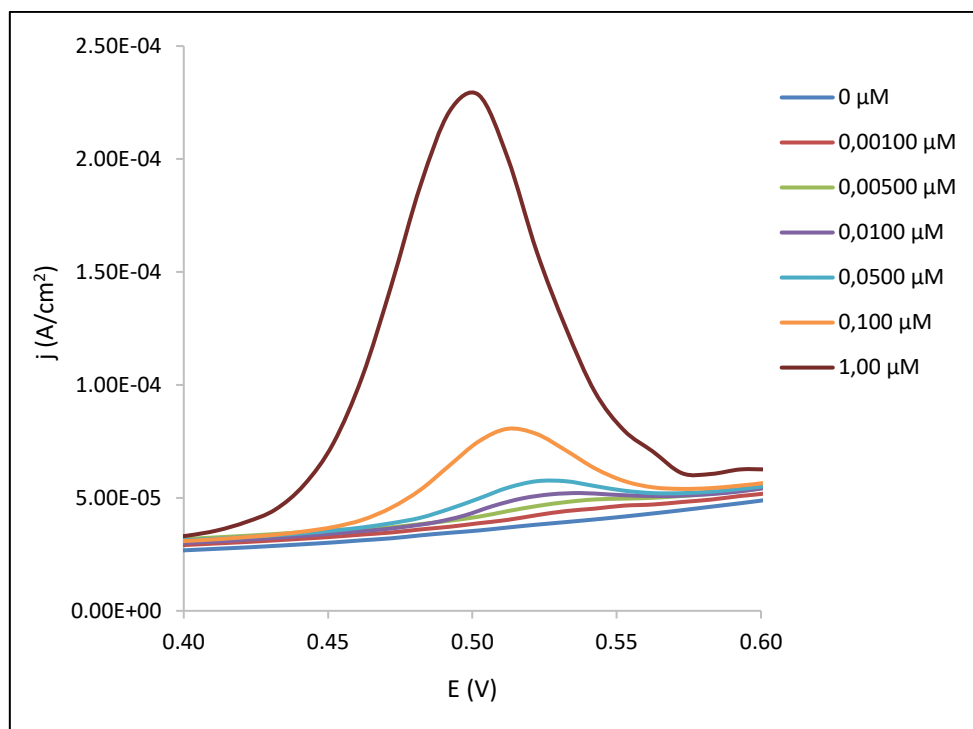


Figura 4.14 – Voltamogramas obtidos por DPV na análise de uma amostra de água de rio (pH do eletrólito = 7; modulação da amplitude = 0,09 V; tempo de modulação = 0,003 s; intervalo de tempo = 0,1 s; degrau de potencial = 0,01 V; tempo de deposição = 180 s; potencial de deposição = 0,4 V).

Através dos resultados obtidos é possível verificar que a amostra de água de rio não contém qualquer vestígio de etinilestradiol, uma vez que o voltamograma obtido para a água sem qualquer fortificação não apresenta qualquer pico. A adição de diferentes concentrações (0,00100, 0,00500, 0,0100, 0,0500, 0,100 e 1,00  $\mu\text{M}$ ) de etinilestradiol à água levou assim à obtenção de sinais proporcionais a essas concentrações. A exatidão do método foi determinada por ensaios de recuperação a estas 6 concentrações e calculada com base na equação 7 em que  $C_{\text{determinada}}$  representa a concentração determinada usando a corrente obtida na curva de calibração e  $C_{\text{real}}$  representa a concentração real existente na amostra.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{determinada}}}{C_{\text{real}}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Os resultados de recuperação obtidos para as concentrações em estudo encontram-se apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultados obtidos na análise de uma amostra de água de rio.

<b>C<sub>real</sub></b> <b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>C<sub>determinada</sub></b> <b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>Recuperação</b> <b>(%)</b>
<b>0,00100</b>	0,000883	88,3
<b>0,00500</b>	0,00458	91,5
<b>0,0100</b>	0,00968	96,8
<b>0,0500</b>	0,0480	96,1
<b>0,100</b>	0,109	109
<b>1,00</b>	1,07	107

As recuperações obtidas situam-se entre 88,3 e 109% indicando que o sensor eletroquímico desenvolvido pode ser utilizado para deteção de etinilestradiol em amostras ambientais.



## 5 Conclusões

A elevada quantidade e diversidade de resíduos de fármacos produzidos e libertados pela sociedade têm levado a que o meio ambiente, em particular o meio aquático, esteja exposto à presença destes contaminantes. Contudo, existe ainda pouca informação relativamente à presença e ao efeito destes compostos no meio ambiente. Isto faz com que os fármacos sejam considerados um grupo importante de CEs e a ter especial atenção, num futuro próximo, no que refere à criação de regulamentação apropriada.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sensor eletroquímico de CP para a deteção do fármaco etinilestradiol. Os elétrodos feitos de CP e CC apresentam-se como uma solução inovadora devido à sua elevada porosidade, boa condutividade eletrónica e elevada resistência mecânica e química.

O pré-tratamento conferido aos elétrodos é normalmente um fator importante no desempenho eletroquímico, nomeadamente na cinética de transferência de eletrões. Estudos de otimização de pré-tratamento demonstraram um melhor desempenho de CP pré-tratado em comparação com CP sem pré-tratamento quando avaliados por CV em hexacianoferrato. Contudo, avaliando o comportamento voltamétrico especificamente para o etinilestradiol, o CP sem pré-tratamento demonstrou ser mais sensível, o que leva a concluir que a eficiência do pré-tratamento poderá depender do tipo de analito em estudo. Assim todos os ensaios referentes à determinação deste fármaco foram realizados com CP sem pré-tratamento, o que torna os ensaios mais simples e rápidos. O comportamento voltamétrico revelou um pico de oxidação a cerca de + 0.53 V sendo este mecanismo de oxidação para este elétrodo controlado por adsorção. Na otimização das condições analíticas em termos de pH da solução, parâmetros de DPV e deposição de analito obteve-se os seguintes valores ótimos: pH 7, amplitude de modulação de 0,09 V, tempo de modulação de 0,003 s, tempo de intervalo de 0,1 s, tempo de modulação de 0,003 s, degrau de potencial de 0,0125 V, tempo de deposição de 180 s e potencial de deposição de 0,4 V.

A curva de calibração geral do etinilestradiol nas condições ótimas previamente determinadas foi realizada com concentrações entre 0,000100 e 6,00  $\mu\text{M}$ , indicando saturação a partir dos 4,00  $\mu\text{M}$ . Diferentes zonas de linearidade podem ser discriminadas na curva de calibração sendo elas de 0,000100 a 0,00100  $\mu\text{M}$ , de 0,00100 a 0,0100  $\mu\text{M}$ ,

de 0,0100 a 0,100  $\mu\text{M}$  e de 0,100 a 1,00  $\mu\text{M}$ . O sensor CP apresentou altos valores de sensibilidade, sendo eles respetivamente 0,00180, 0,00238, 0,000238 e 0,000145  $\text{A}/(\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2)$ . Equivalentemente, os valores de LOD alcançados pelo CP foram excelentes, correspondendo respetivamente a 0,00045, 0,00019, 0,016 e 0,29  $\mu\text{M}$ .

No estudo do desempenho analítico do CP utilizou-se uma amostra de água do rio, retirada após uma ETAR, e não se obteve qualquer pico na zona de potencial do etinilestradiol. Para validação do sensor procedeu-se à fortificação da amostra com a adição de diferentes tomas de solução padrão de forma a obter concentrações de 0,001, 0,00500, 0,0100, 0,0500, 0,100 e 1,00  $\mu\text{M}$ , obtendo-se uma percentagem de recuperação entre 88,3% e 109%, revelando uma boa aceitabilidade deste CP para determinação de etinilestradiol em amostras de água.

Pode concluir-se que o eléctrodo CP pode trazer vantagens analíticas quer laboratorialmente, quer *in situ*, devido à facilidade de construção, baixo custo e bom desempenho eletroquímico, apresentando-se como uma boa solução analítica em determinações ambientais.

## Bibliografia

- [1] Vandermeersch, G., Lourenço, H., Alvarez-Muñoz, D., Cunha, S., Diogène, J., Cano-Sancho, G., Sloth, J., Kwadijk, C., Barcelo, D., Allegaert, W., Bekaert, K., Fernandes, J., Marques, A., & Robbens, J. (2015). Environmental contaminants of emerging concern in seafood - European database on contaminant levels. *Environmental Research*, 143, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.011>.
- [2] Gaffney, V., Cardoso, V., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M., & Almeida, C. (2014). Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*, 37(1), 138-149.
- [3] Osawa, R. (2019). Degradação de contaminantes emergentes: um estudo por espectrometria de massa e outras técnicas analíticas, Tese de Doutoramento em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. pp. 224.
- [4] Rathi, B. S., Kumar, P. S., & Show, P. L. (2021). A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124413. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124413>.
- [5] Torrinha, Á., Oliveira, T. M. B. F., Ribeiro, F. W. P., Correia, A. N., Lima-Neto, P., & Morais, S. (2020). Application of nanostructured carbon-based electrochemical (Bio)sensors for screening of emerging pharmaceutical pollutants in waters and aquatic species: A review. *Nanomaterials*, 10, 1–29. AG. <https://doi.org/10.3390/nano10071268>.
- [6] Kmmerrer, K. (2010). Pharmaceuticals in the environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 35, 57–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-052809-161223>.
- [7] Blair, B., Nikolaus, A., Hedman, C., Klaper, R., & Grundl, T. (2015). Evaluating the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment. *Chemosphere*, 134, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.078>.

- [8] World Water Assessment Programme (United Nations). Wastewater: The untapped resource: The United Nations world water development report 2017.
- [9] Rodrigues, A. (2013). Resíduos farmacêuticos no ambiente, Tese de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. pp. 104.
- [10] Paíga, P., Correia, M., Fernandes, M. J., Silva, A., Carvalho, M., Vieira, J., Jorge, S., Silva, J. G., Freire, C., & Delerue-Matos, C. (2019). Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation. *Science of the Total Environment*, 648, 582–600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.129>.
- [11] Mansano, T. (2016). Tratamento de Efluentes Industriais e Domésticos através da Digestão Anaeróbia por Reator UASB, Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Escola Superior de Tecnologia e Gestão. pp. 178.
- [12] Mateo-Sagasta, J., Zadeh, S. M., & Turrall, H. (2018). More people, more food, worse water? a global review of water pollution from agriculture. [www.fao.org/](http://www.fao.org/).
- [13] Bisceglia, K. J., Yu, J. T., Coelhan, M., Bouwer, E. J., & Roberts, A. L. (2010). Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(4), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.062>.
- [14] Camacho-Muñoz, M. D., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2010). Presence of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain) main watersheds. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), 1159–1162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.030>.
- [15] Olaitan, O.J., Anyakora, C., Bamiro, T., Tella, A.T. (2014) Determination of pharmaceutical compounds in surface and underground water by solid phase extraction-liquid chromatography, *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 6, 20-26.
- [16] Pinto, E. (2011). Impacte ambiental dos medicamentos, Tese de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. pp. 79.

- [17] Nunes, B. (2011). A presença de fármacos no ambiente, Tese de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. pp. 45-54.
- [18] Barrios, R., Sierra, C., Morales, J. (2015). Antibiotic resistant bacteria in aqueous ecosystems. *Producción + Limpia*, 10(2), 160-172.
- [19] Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Jacobs, S., Serra-Compte, A., Cáceres, N., Sioen, I., Verbeke, W., Barbosa, V., Ferrari, F., Fernández-Tejedor, M., Cunha, S., Granby, K., Robbens, J., Kotterman, M., Marques, A., & Barceló, D. (2018). Pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw and cooked seafood from European market: Concentrations and human exposure levels. *Environment International*, 119, 570–581. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.006>.
- [20] Santos, J. (2012). Resíduos de Medicamentos: Riscos Associados e Comportamento da População Portuguesa, Tese de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. pp. 84.
- [21] Ratola, D. (2014). Recursos piscatórios: análise das condicionantes do consumo e das perceções da sustentabilidade dos recursos, Dissertação de Mestrado Gestão e Conservação de Recursos Naturais, Universidade de Évora. pp.89.
- [22] K. B., A, Bhat, V. S., Varghese, A., George, L., & Hegde, G. (2019). Non-Enzymatic Electrochemical Determination of Progesterone Using Carbon Nanospheres from Onion Peels Coated on Carbon Fiber Paper. *Journal of The Electrochemical Society*, 166(13), B1097–B1106. <https://doi.org/10.1149/2.0251913jes>.
- [23] Oliveira, J. (2011). Eletroanálise de fármacos em células eletroquímicas miniaturizadas, Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora. pp. 60.
- [24] Cerqueira, S. (2019). Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para monitorização da radioterapia no melanoma, Dissertação de Mestrado em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica, Instituto Superior de Engenharia do Porto. pp. 101.

- [25] Silva, L. (2011). Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental, Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio Janeiro. pp. 154.
- [26] Ribeiro, J. (2013). Caraterização e Otimização de Sensores Eletroquímicos para Aminas Biogénicas, Dissertação para obter o grau de Doutor em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. pp. 247.
- [27] Ensafi, Ali A. (2019). An introduction to sensors and biosensors. *Electrochemical Biosensors*. Elsevier, 2019. 1–10.
- [28] Oliveira, A. (2019). Desenvolvimento de um sensor eletroquímico seletivo para a deteção de Alfa-Fetoproteína, Dissertação de Mestrado em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica, Instituto Superior de Engenharia do Porto. pp. 73.
- [29] Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.
- [30] Fonseca, I., Proença, L., Capelo, S. (2015). Voltar ao Início a Voltametria Cíclica e de Varrimento Linear Unidirecional: Suas Potencialidades na Caraterização de Processos de Corrosão. *Corrosão e Proteção de Materiais*, 34, 12–21.
- [31] <https://pt.wikipedia.org/wiki/Potenciostato> (acedido a 13 de março de 2021).
- [32] [https://petermattia.com/cyclic\\_voltammetry\\_simulation/simulation.html](https://petermattia.com/cyclic_voltammetry_simulation/simulation.html) (acedido a 13 de março de 2021).
- [33] Maheshwari, P. H. (2019). Developing the processing stages of carbon fiber composite paper as efficient materials for energy conversion, storage, and conservation. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(3), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.04.004>.
- [34] Zhang, J, Zhang, H, Wu, J, Zhang, J. (2013). Design and Fabrication of PEM Fuel Cell MEA, Single Cell, and Stack. *Pem Fuel Cell Testing and Diagnosis*, 43 – 80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53688-4.00002-4>.
- [35] Takahagi, T., Shimada, I., Fukuharam M., Morita, K., Ishitani, A. (1986). XPS studies on the chemical structure of the stabilized polyacrylonitrile fiber in the carbon

fiber production process. *Journal of Polymer Chemistry*, 24, 3101–3107. <https://doi.org/10.1002/pola.1986.080241134>.

[36] Khayyam, H., Naebe, M., Bab-Hadiashar, A., Jamshidi, F., Li, Q., Atkiss, S., Buckmaster, D., & Fox, B. (2015). Stochastic optimization models for energy management in carbonization process of carbon fiber production. *Applied Energy*, 158, 643–655. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.08.008>.

[37] Wang, Y., Wang, C. Y., & Chen, K. S. (2007). Elucidating differences between carbon paper and carbon cloth in polymer electrolyte fuel cells. *Electrochimica Acta*, 52(12), 3965–3975. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.11.012>.

[38] Torrinha, Á., & Morais, S. (2021). Electrochemical (bio)sensors based on carbon cloth and carbon paper: An overview. *Trends in Analytical Chemistry*, 142, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116324>.

[39] Liu, Z., Fan, T., Zhang, Y., Ren, X., Wang, Y., Ma, H., & Wei, Q. (2020). Electrochemical assay of ampicillin using Fe<sub>3</sub>N-CO<sub>2</sub>N nanoarray coated with molecularly imprinted polymer. *Microchimica Acta*, 187(8), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04432-2>.

[40] Torrinha, Á., Martins, M., Tavares, M., Delerue-Matos, C., & Morais, S. (2021). Carbon paper as a promising sensing material: Characterization and electroanalysis of ketoprofen in wastewater and fish. *Talanta*, 226, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122111>.

[41] Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Ferreira, C., & Rocha, E. (2012). Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94(2), 252 – 261. <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.642874>.

[42] Ghoneim, E. M., El-Desoky, H. S., & Ghoneim, M. M. (2006). Adsorptive cathodic stripping voltammetric assay of the estrogen drug ethinylestradiol in pharmaceutical formulation and human plasma at a mercury electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(2), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.07.024>.

- [43] Li, C. (2007). Voltammetric determination of ethinylestradiol at a carbon paste electrode in the presence of cetyl pyridine bromine. *Bioelectrochemistry*, 70(2), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.10.001>.
- [44] Martínez, N. A., Schneider, R. J., Messina, G. A., & Raba, J. (2010). Modified paramagnetic beads in a microfluidic system for the determination of ethinylestradiol (EE2) in river water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6), 1376–1381. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.031>.
- [45] Liu, X., Feng, H., Liu, X., & Wong, D. K. Y. (2011). Electrocatalytic detection of phenolic estrogenic compounds at NiTPPS|carbon nanotube composite electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 689(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.037>.
- [46] Martínez, N. A., Pereira, S. v., Bertolino, F. A., Schneider, R. J., Messina, G. A., & Raba, J. (2012). Electrochemical detection of a powerful estrogenic endocrine disruptor: Ethinylestradiol in water samples through bioseparation procedure. *Analytica Chimica Acta*, 723, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.02.033>.
- [47] Muna, G. W., Partridge, M., Sirhan, H., VerVaet, B., Guerra, N., & Garner, H. (2014). Electrochemical detection of steroid hormones using a nickel-modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 26(10), 2145–2151. <https://doi.org/10.1002/elan.201400361>.
- [48] Pavinatto, A., Mercante, L. A., Leandro, C. S., Mattoso, L. H. C., & Correa, D. S. (2015). Layer-by-Layer assembled films of chitosan and multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical detection of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 755, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.08.002>.
- [49] Canevari, T. C., Cincotto, F. H., Nakamura, M., Machado, S. A. S., & Toma, H. E. (2016). Efficient electrochemical biosensors for ethinylestradiol based on the laccase enzyme supported on single walled carbon nanotubes decorated with nanocrystalline carbon quantum dots. *Analytical Methods*, 8(39), 7254–7259. <https://doi.org/10.1039/c6ay02178f>.
- [50] Cincotto, F. H., Martínez-García, G., Yáñez-Sedeño, P., Canevari, T. C., Machado, S. A. S., & Pingarrón, J. M. (2016). Electrochemical immunosensor for ethinylestradiol

using diazonium salt grafting onto silver nanoparticles-silica-graphene oxide hybrids. *Talanta*, 147, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.061>.

[51] Nunes, C. N., Pauluk, L. E., Felsner, M. L., Egéa Dos Anjos, V., & Quináia, S. P. (2016). Rapid Screening Method for Detecting Ethinyl Estradiol in Natural Water Employing Voltammetry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/3217080>.

[52] Perez, C., Simões, F. R., & Codognoto, L. (2016). Voltammetric determination of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol hormone in supply dam using BDD electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 20(9), 2471–2478. <https://doi.org/10.1007/s10008-015-3091-5>.

[53] Smajdor, J., Piech, R., Pięk, M., & Paczosa-Bator, B. (2017). Sensitive Voltammetric Determination of Ethinyl Estradiol on Carbon Black Modified Electrode. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(13), H885–H889. <https://doi.org/10.1149/2.0851713jes>.

[54] Pavinatto, A., Mercante, L. A., Facure, M. H. M., Pena, R. B., Sanfelice, R. C., Mattoso, L. H. C., & Correa, D. S. (2018). Ultrasensitive biosensor based on polyvinylpyrrolidone/chitosan/reduced graphene oxide electrospun nanofibers for 17 $\alpha$  – Ethinylestradiol electrochemical detection. *Applied Surface Science*, 458, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.07.035>.

[55] Coelho, M., Silva, D., & Pereira, A. (2019). Development of Electrochemical Sensor Based on Carbonaceous and Metal Phthalocyanines Materials for Determination of Ethinyl Estradiol. *Chemosensors*, 7(3), 32. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7030032>.

[56] Triviño, J. J., Gómez, M., Valenzuela, J., Vera, A., & Arancibia, V. (2019). Determination of a natural (17 $\beta$ -estradiol) and a synthetic (17 $\alpha$ -ethinylestradiol) hormones in pharmaceutical formulations and urine by adsorptive stripping voltammetry. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 297, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126728>.

[57] Zheng, Z. xiang, Wang, M., Shi, X. zhao, & Wang, C. ming. (2019). Palladium Nanoparticles/Graphitic Carbon Nitride Nanosheets-Carbon Nanotubes as a Catalytic Amplification Platform for the Selective Determination of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Feedstuffs. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50087-2>.

- [58] Nodehi, M., Baghayeri, M., Ansari, R., & Veisi, H. (2020). Electrochemical quantification of  $17\alpha$  – Ethinylestradiol in biological samples using a Au/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TA/MWNT/GCE sensor. *Materials Chemistry and Physics*, 244, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122687>.
- [59] Santos, A. M., Wong, A., Prado, T. M., Fava, E. L., Fatibello-Filho, O., Sotomayor, M. D. P. T., & Moraes, F. C. (2021). Voltammetric determination of ethinylestradiol using screen-printed electrode modified with functionalized graphene, graphene quantum dots and magnetic nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers. *Talanta*, 224, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121804>.
- [60] Silva, L. R. G., Rodrigues, J. G. A., Franco, J. P., Santos, L. P., D'Elia, E., Romão, W., & Ferreira, R. de Q. (2021). Development of a portable electroanalytical method using nickel modified screen-printed carbon electrode for ethinylestradiol determination in organic fertilizers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111430>.
- [61] Ribeiro, C., Souza, J. R., Silva, M. A., & Paterno, L. G. (2021). Voltammetric Detection of Ethinylestradiol in Water and Synthetic Urine Samples using a Ni(II) Phthalocyanine/Iron Oxide Nanocomposite Electrode. *Electroanalysis*, 33(3), 609–617. <https://doi.org/10.1002/elan.202060396>.
- [62] Mongay, C., & Cerda, V. (1974). A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. *Annales de Chimie*, 64, 409-412.
- [63] Vernasqui, L. (2017). Análise do fenol por voltametria cíclica: elétrodos compósitos de resina epoxídica, grafite e óxidos de metal, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia Ambiental, Escola Superior Agrária. pp. 62.
- [64] Troiani, E. (2007). Desenvolvimento de eletrodo modificado com filme de poli (1-aminoantraceno) para determinação de dopamina em formulação farmacêutica, Dissertação para obtenção do título de Mestre em Química, Universidade Federal de São Paulo. pp. 99.

## A Anexos

### A.1 Pré-tratamento

#### Acetona, Etanol e Água (Com/Sem ultrassons)

Os resultados de intensidade da corrente em função do potencial aplicado para os pré-tratamentos de acetona, etanol e água encontram-se apresentados na Figura A.1.

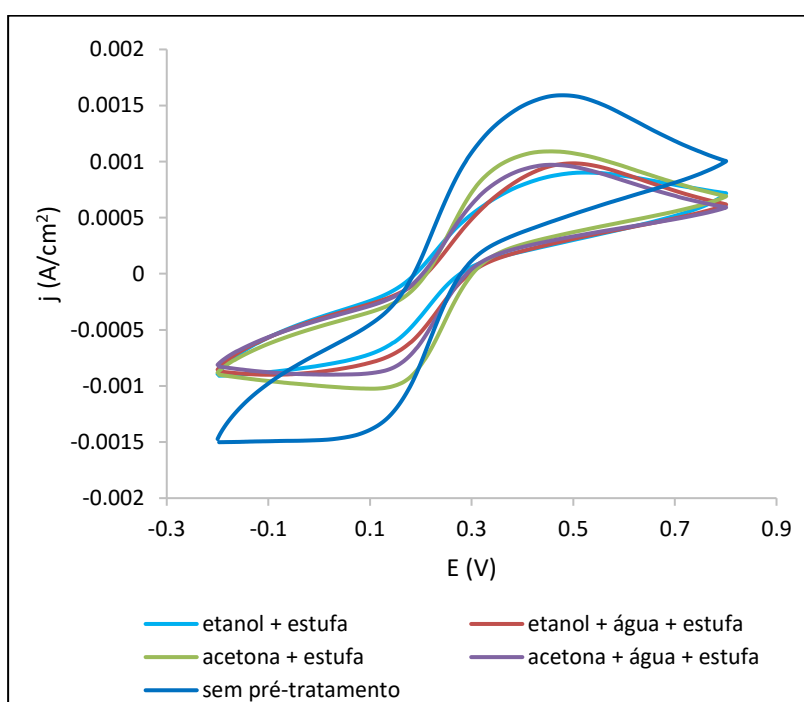


Figura A.1 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de acetona, etanol e água.

Comparando os 4 pré-tratamentos com o eletrodo sem pré-tratamento, verifica-se que nenhum exibe um bom comportamento, uma vez que com os pré-tratamentos a intensidade da corrente diminuiu e os picos de oxidação e redução não estão definidos.

#### Ácidos diluídos

Para os pré-tratamentos em ácidos diluídos os resultados de intensidade da corrente em função do potencial aplicado encontram-se apresentados na Figura A.2.

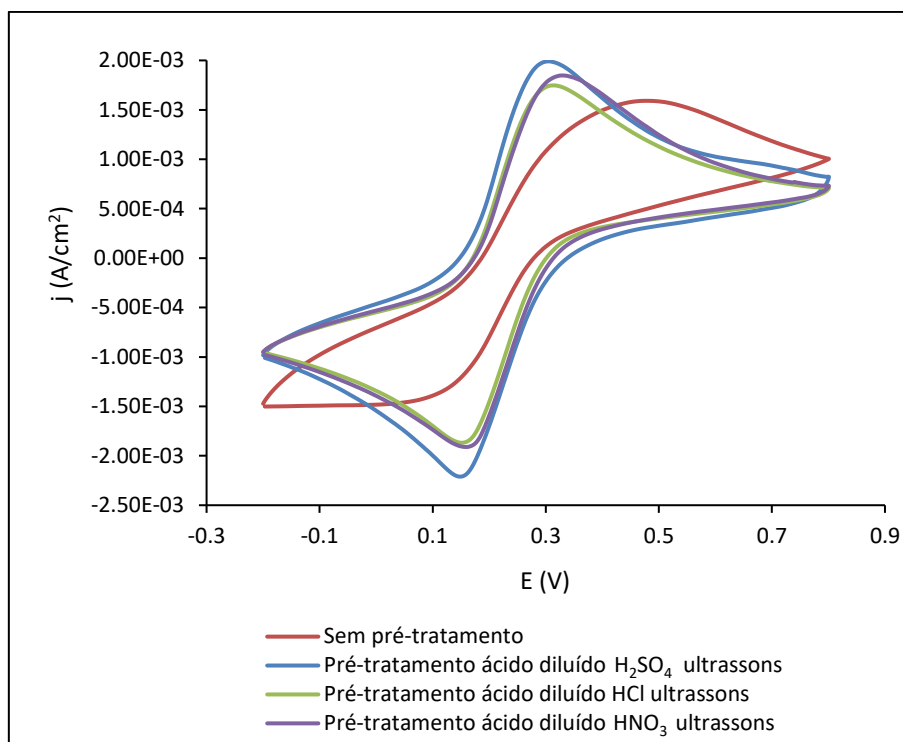


Figura A.2 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos diluídos.

Comparando o comportamento dos 3 pré-tratamentos apresentados na Figura A.2 é possível verificar que em relação ao eletrodo sem pré-tratamento, todos exibem picos de oxidação e redução mais definidos e maior intensidade da corrente.

A partir dos voltamogramas foram determinados os picos anódicos ( $I_{pa}$ ) e catódicos ( $I_{pc}$ ), a fim de possibilitar o cálculo da razão entre as intensidades de pico ( $I_{pc}/I_{pa}$ ), e a variação do potencial redox anódico e catódico ( $\Delta E_p$ ). Os parâmetros calculados para cada eletrodo apresentam-se na Tabela A.1.

Tabela A.1 – Parâmetros para avaliação dos eletrodos pré-tratados em ácidos diluídos.

Eléctrodo	$I_{pc}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pa}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pc}/I_{pa}$	$\Delta E_p$ (V)
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,00191	0,00225	0,848	0,157
<b>HCl</b>	0,00186	0,00203	0,916	0,154
<b>HNO<sub>3</sub></b>	0,00183	0,00205	0,893	0,171

A partir dos valores obtidos na Tabela A.1 conclui-se que o eletrodo pré-tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído apresenta maior intensidade de corrente de ambos os picos, mas apresenta

um valor baixo de reversibilidade (0,848). O eletrodo pré-tratado com HCl apresenta um melhor desempenho quando comparado com os restantes, porque apresenta  $I_{pc}/I_{pa}$  mais elevada (próxima de 1,0) e  $\Delta E_p$  mais baixa.

### Ácidos concentrados

Os voltamogramas obtidos para os pré-tratamentos em ácidos concentrados encontram-se apresentados na Figura A.3.

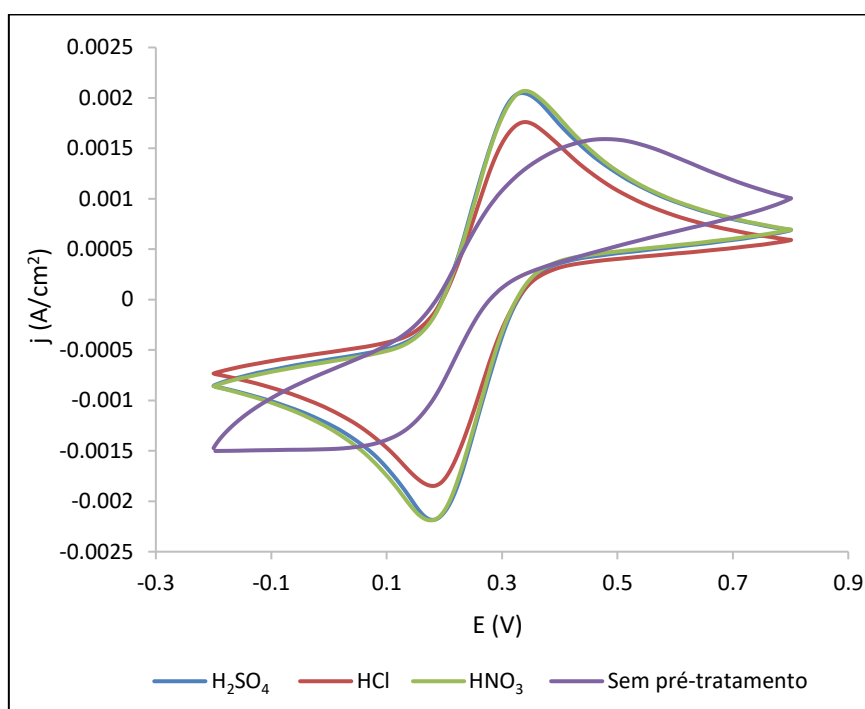


Figura A.3 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos concentrados.

Através dos resultados obtidos na Figura A.3 é possível verificar que os três pré-tratamentos apresentam melhorias na definição dos picos e na intensidade da corrente, quando comparados com o eletrodo sem pré-tratamento.

Para avaliação do melhor pré-tratamento foram calculados os parâmetros para cada eletrodo. Os parâmetros encontram-se apresentados na Tabela A.2.

Tabela A.2 – Parâmetros para avaliação dos elétrodos pré-tratados em ácidos concentrados.

Elétrodo	$I_{pc}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pa}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pc}/I_{pa}$	$\Delta E_p$ (V)
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,00233	0,00245	0,954	0,155
<b>HCl</b>	0,00198	0,00207	0,955	0,158
<b>HNO<sub>3</sub></b>	0,00237	0,00247	0,960	0,166

Ao observar os valores obtidos na Tabela A.2 verifica-se que o pré-tratamento que mais se destaca é o pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, uma vez que apresenta elevada intensidade da corrente para ambos os picos,  $I_{pc}/I_{pa}$  próxima de 1,0 e tem a variação do potencial mais baixa.

### Eletroquímico com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Os voltamogramas para os pré-tratamentos eletroquímicos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> encontram-se na Figura A.4.

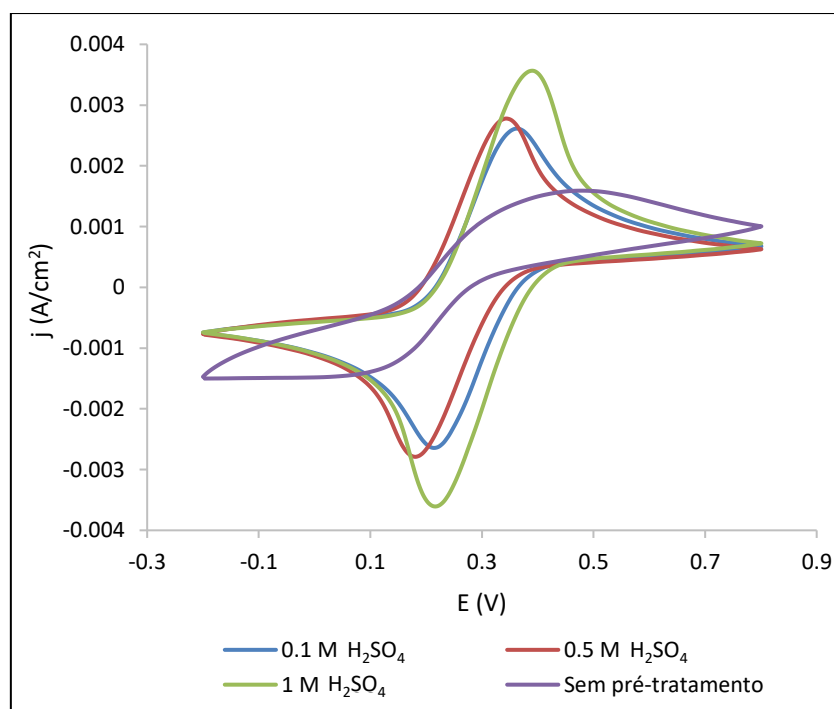


Figura A.4 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos eletroquímicos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ao analisar os resultados obtidos na Figura A.4 é possível verificar que em relação ao eletrodo sem pré-tratamento, todos os pré-tratamentos apresentam picos de oxidação e redução mais definidos.

Os parâmetros calculados para a avaliação dos eletrodos estão apresentados na Tabela A.3.

Tabela A.3 – Parâmetros para avaliação dos eletrodos pré-tratados eletroquimicamente com  $H_2SO_4$ .

<b>Eléctrodo</b>	<b><math>I_{pc}</math> (A/cm<sup>2</sup>)</b>	<b><math>I_{pa}</math> (A/cm<sup>2</sup>)</b>	<b><math>I_{pc}/I_{pa}</math></b>	<b><math>\Delta E_p</math> (V)</b>
<b><math>H_2SO_4</math> 0,1 M</b>	0,00295	0,00291	1,02	0,148
<b><math>H_2SO_4</math> 0,5 M</b>	0,00300	0,00299	1,00	0,161
<b><math>H_2SO_4</math> 1 M</b>	0,00387	0,00388	0,997	0,172

Através dos valores obtidos na Tabela A.3 conclui-se que o eletrodo pré-tratado electroquimicamente em  $H_2SO_4$  1 M apresenta picos de oxidação e redução mais definidos, maior intensidade da corrente para ambos os picos e apresentou também uma boa reversibilidade (0,997) embora o distanciamento entre picos também tenha aumentado (0,172 V), consequência do aumento da intensidade dos picos.

### **Ácidos Diluídos e Etanol**

Relativamente aos pré-tratamentos em ácidos diluídos e etanol, os resultados de intensidade da corrente em função do potencial aplicado encontram-se na Figura A.5.

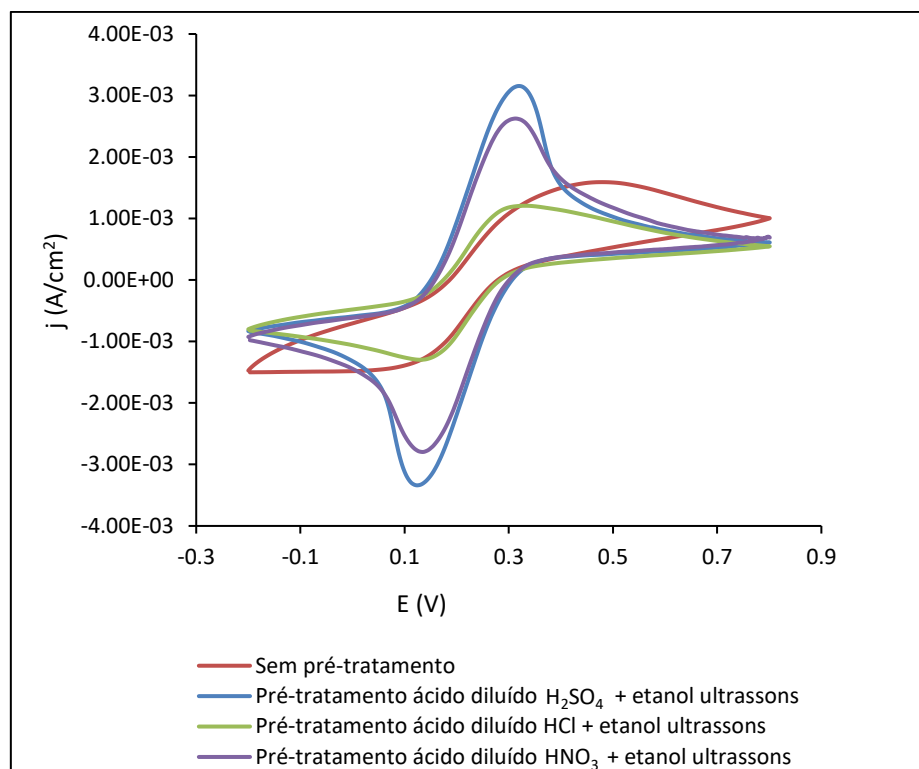


Figura A.5 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos diluídos e etanol.

Nos voltamogramas da Figura A.5 é possível verificar que em relação ao eletrodo sem pré-tratamento, nem todos apresentam um bom desempenho. Para o eletrodo pré-tratado em HCl diluído e etanol ocorre a diminuição da intensidade da corrente e os picos de oxidação e redução não estão definidos.

Os parâmetros calculados para os eletrodos que apresentam um bom desempenho estão apresentados na Tabela A.4.

Tabela A.4 – Parâmetros para avaliação dos eletrodos pré-tratados em ácidos diluídos e etanol.

Eléctrodo	$I_{pc}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pa}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pc}/I_{pa}$	$\Delta E_p$ (V)
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,00340	0,00353	0,964	0,203
<b>HNO<sub>3</sub></b>	0,00283	0,00293	0,966	0,186

Através da Tabela A.4 conclui-se que o eletrodo pré-tratado em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído e etanol apresenta picos de oxidação e redução bem definidos, maior intensidade da corrente e  $I_{pc}/I_{pa}$  próxima de 1,0.

## Ácidos Diluídos e Acetona

Os resultados de intensidade da corrente em função do potencial aplicado para os pré-tratamentos de ácidos diluídos e acetona encontram-se apresentados na figura A.6.

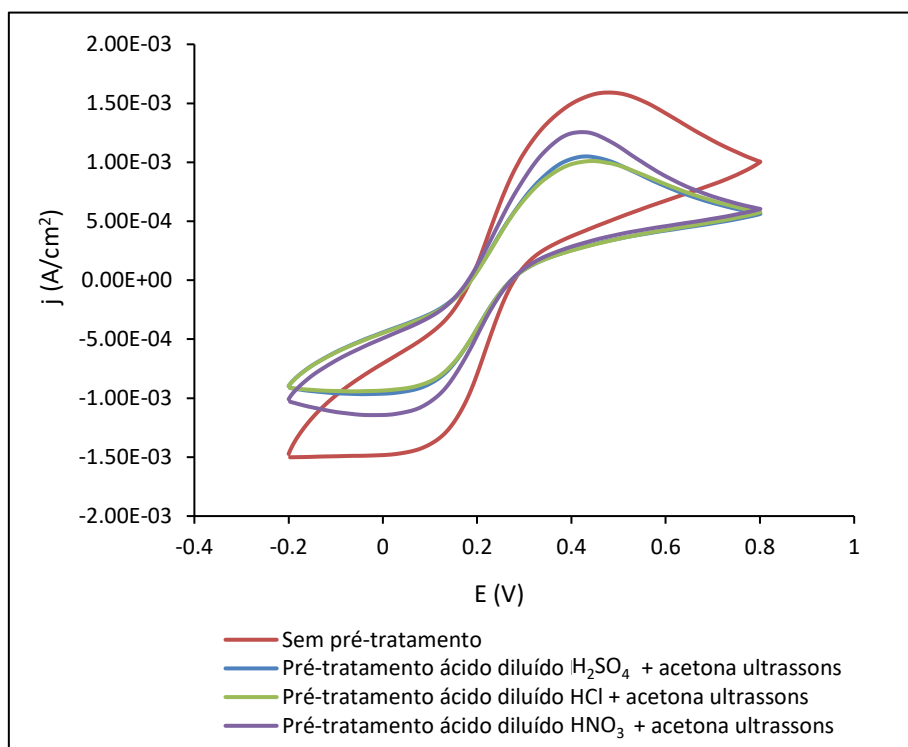


Figura A.6 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos diluídos e acetona.

Ao observar os voltamogramas dos 3 pré-tratamentos é possível verificar que nenhum exibe picos de oxidação e redução bem definidos e apresentam baixa intensidade da corrente.

## Ácidos 3 M e Etanol

Relativamente aos pré-tratamentos em ácidos 3 M e etanol, os resultados de intensidade da corrente em função do potencial aplicado encontram-se na Figura A.7.

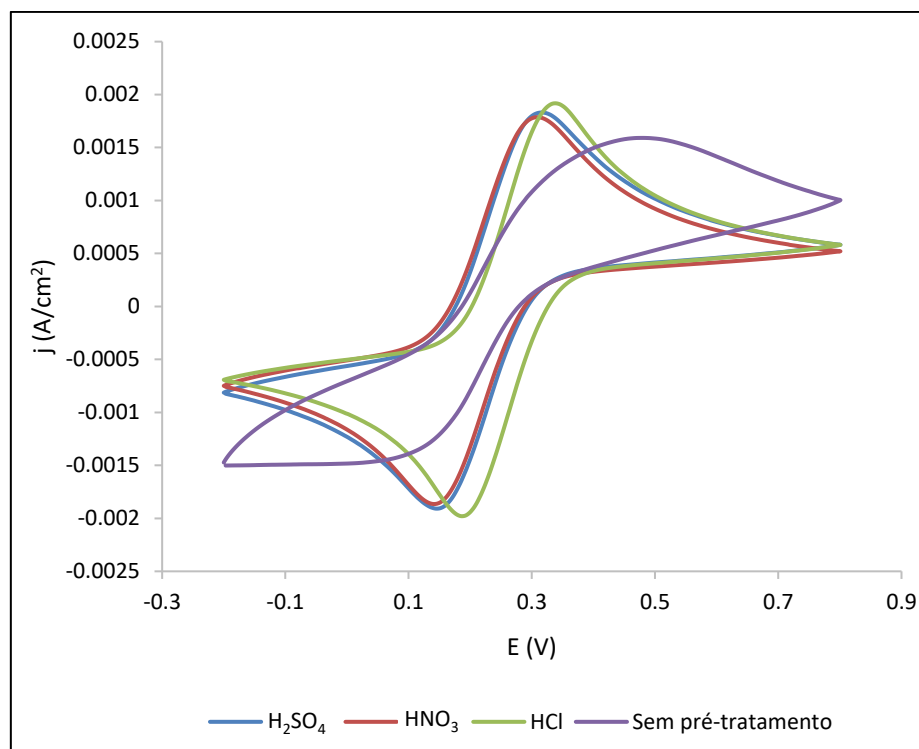


Figura A.7 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos 3 M e etanol.

Observando os voltamogramas da Figura A.7 é possível verificar que os 3 pré-tratamentos exibem picos de oxidação e redução mais definidos e maior intensidade da corrente, em comparação com o eletrodo não tratado. Na Tabela A.5 apresentam-se calculados os parâmetros para avaliação dos eletrodos.

Tabela A.5 – Parâmetros para avaliação dos eletrodos pré-tratados em ácidos 3 M e etanol.

Eléctrodo	$I_{pc}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pa}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pc}/I_{pa}$	$\Delta E_p$ (V)
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,00205	0,00213	0,964	0,173
<b>HNO<sub>3</sub></b>	0,00195	0,00205	0,951	0,170
<b>HCl</b>	0,00215	0,00222	0,969	0,154

Ao analisar a Tabela A.5 observa-se que o pré-tratamento com HCl é o que mais se destaca pela positiva em todos os parâmetros.

## Ácidos 1 M e Eletroquímico

Os voltamogramas dos pré-tratamentos de ácidos 1 M e eletroquímico encontram-se apresentados na figura A.8.

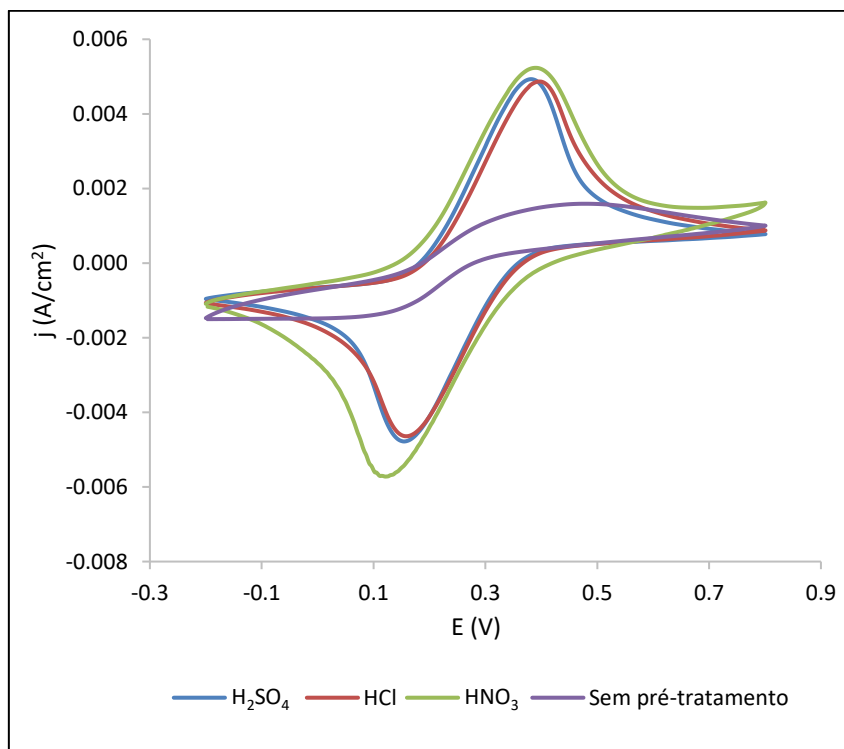


Figura A.8 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de ácidos 1 M e eletroquímico.

Nos resultados obtidos na Figura A.8 é possível verificar que em relação ao eléctrodo sem pré-tratamento, todos apresentam um bom desempenho. Os parâmetros calculados para avaliação dos eléctrodos estão registados na Tabela A.6.

Tabela A.6 – Parâmetros para avaliação dos eléctrodos pré-tratados em ácidos diluídos e eletroquímico.

Eléctrodo	$I_{pc}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pa}$ (A/cm <sup>2</sup> )	$I_{pc}/I_{pa}$	$\Delta E_p$ (V)
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0,00522	0,00516	1,01	0,227
<b>HCl</b>	0,00496	0,00477	1,04	0,239
<b>HNO<sub>3</sub></b>	0,00481	0,00330	1,45	0,268

Na análise da Tabela A.6 conclui-se que o eletrodo pré-tratado em  $H_2SO_4$  é o que mais se destaca, pois apresenta picos de oxidação e redução bem definidos,  $I_{pc}/I_{pa}$  mais próximo de 1,0 e  $\Delta E_p$  menor.

### Etanol/Acetona e Eletroquímico (Com/Sem Água)

Relativamente aos pré-tratamentos em etanol/acetona e electroquimicamente, os resultados de intensidade da corrente em função do potencial aplicado encontram-se apresentados na figura A.9.

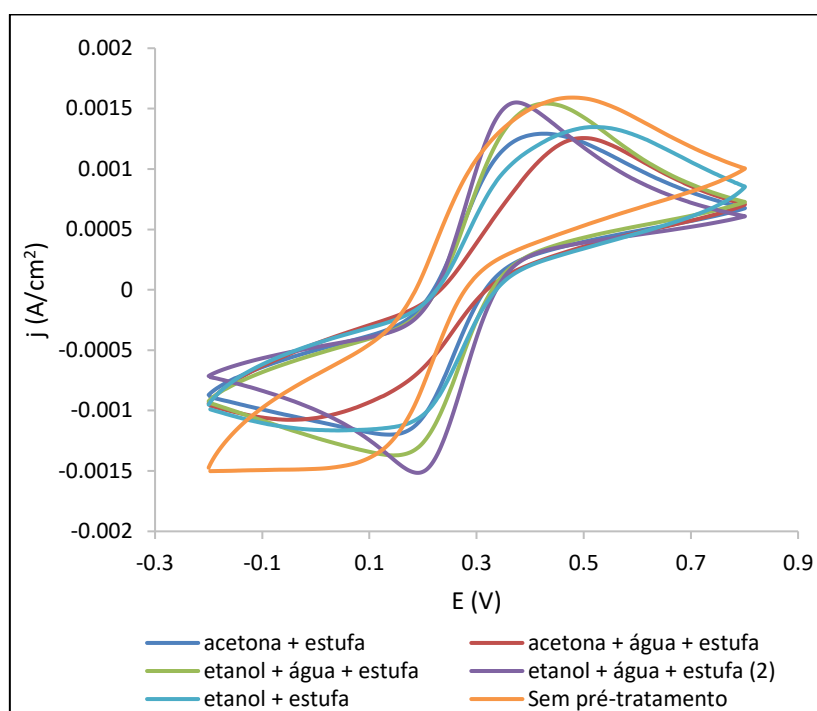


Figura A.9 – Intensidade da corrente em função do potencial aplicado em pré-tratamentos de acetona/etanol e electroquimicamente com  $H_2SO_4$  1 M.

Comparando os resultados obtidos na Figura A.9 é possível verificar que o eletrodo pré-tratado com etanol e electroquimicamente com  $H_2SO_4$  1 M (2), apresenta uma maior intensidade da corrente e picos de oxidação e redução definidos. Os restantes eletrodos não apresentam picos bem definidos.