



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Camila de Lima Ribeiro**

**TESE DE DOUTORADO**

**ELETRODOS MODIFICADOS COM FILMES AUTOMONTADOS DE  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO E FTALOCIANINA PARA  
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ELETROQUÍMICA DE  
ETINILESTRADIOL**

**Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza**

**Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno**

**Brasília-DF**

**2020**

**Camila de Lima Ribeiro**

**ELETRODOS MODIFICADOS COM FILMES AUTOMONTADOS DE  
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO E FTALOCIANINA PARA  
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO ELETROQUÍMICA DE  
ETINILESTRADIOL**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade de Brasília, como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Doutora em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza**

**Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno**

Brasília-DF

2020

## AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de todas as coisas e a luz que nos faz vencer diante dos obstáculos, sem a sua presença na minha vida, nada disso teria sentido.

Aos meus pais, Noeme de Lima e José de Sousa meus exemplos de vida, pelo apoio, compreensão, carinho, incentivo a nunca desistir dos meus sonhos e pelos esforços feitos para que eu tivesse uma educação de qualidade.

Ao meu querido companheiro Rubens Moreira pelo amor, carinho, paciência, incentivo e colaboração durante a realização deste trabalho.

À toda minha família que me orgulho de fazer parte, em especial meu irmão Roberval Ribeiro pelo apoio, ajuda e total disposição em contribuir sempre que precisei nessa trajetória e aos meus avós Maria Lima e Cecílio Lima por todo carinho sempre.

À minhas amigas Tádila Alves, Elienay Cavalcante, Maryanne Barbosa, Josiene Silva, Euzedith Sousa, Djany Sousa, Fernanda Sodré, N dia Alves e Mismeble Santos pelo incentivo e torcida para que conseguisse alcançar esse objetivo. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza e Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno, pela paciência, ensinamentos, incentivo, ideias e disposi o em contribuir sempre que solicitados no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LQAA) em especial Ariadna Campos, Joelma Portela, João Pedro de Souza e Enoc Lima pelos conhecimentos compartilhados e colabora es na realiza o deste trabalho. Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LABPOLN) em especial Priscila Rios, Alan Baggio, Marcos Andriola, Caio Coradi e Emiliano Gomes por todas as contribui es.

  Prof. Dra. Heather Buckley pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos durante o Doutorado, por meio de um estágio no seu grupo de pesquisa na University of Victoria no Canadá, sou grata a ela e sua equipe por toda generosidade e cuidado comigo, além disso, agradeço a minhas amigas Célia Baía e Luana da Costa que tornaram este período longe de casa mais divertido.

Agradeço também ao Prof. Dr. Fernando Sodré e ao Dr. Thiago Sampaio por terem cedido a amostra de água para análise. Ao Prof. Dr. Joel Rubim e ao Dr. Vianney Santos Jr. pelas medidas de Espectroscopia de Raman. Ao Dr. Cléber Lopes Filomeno pelo preparo das nanop rculas de maguemitita. Ao Prof. Dr. Sanclayton G. C. Moreira pelos espectros de UV-

Vis dos diferentes pontos do filme. Ao Prof. Dr. Marcelo Pereira-da-Silva pelas imagens de AFM. Ao Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biologia da UnB pelas medidas de EDX, MEV e MET. À Central Analítica do Instituto de Química da UnB pelas medidas de DRX e a disponibilização do equipamento de espectroscopia de UV-Vis. Ao Laboratório de Nanobiotecnologia do IB-UnB pela disponibilização do equipamento para as medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico.

Ao Prof. Dr. Jose Joaquin Linares, Prof. Dr. Flavio Colmati Junior e o Prof. Dr. Jonatas Gomes da Silva por contribuírem aceitando participar da banca examinadora.

Ao CNPQ pela bolsa de doutorado, a FAP-DF pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio parcial da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001. Por fim agradeço à todos os servidores do Instituto de Química (IQ-UnB) pelos serviços oferecidos.

## RESUMO

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para determinação de etinilestradiol (EE2). Para tanto, substratos de vidro condutor tipo ITO foram modificados com filmes automontados LbL de ftalocianina de níquel(II) tetrasulfonada (NiTsPc) e nanopartículas de óxido de ferro (ION) para a construção do eletrodo de trabalho. A modificação foi realizada pela imersão sucessiva (ciclo de deposição) do ITO na solução de NiTsPc e na suspensão de ION, originando eletrodos do tipo ITO/(NiTsPc/ION)-n, onde n representa o número de ciclos de deposição ou bicamadas. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM) do eletrodo evidenciaram uma superfície rugosa e uniformemente recoberta por nanopartículas. Dados de espectroscopia de absorção no UV-vis e espectroscopia Raman sugerem que a deposição sucessiva de bicamadas de NiTsPc/ION forma uma estrutura supramolecular porosa conduzida tanto pela interação eletrostática quanto por pontes covalentes de Fe(III)-O-Ni(II). O eletrodo ITO(ION/NiTsPc)-n foi utilizado na detecção de EE2 por voltametria de pulso diferencial (VPD). Inicialmente, observou-se que eletrodos de ITO modificados com ION e NiTsPc em separado apresentam desempenho muito inferior na oxidação do EE2 que ocorre em +0,8V. Além disso, verificou-se que a oxidação de EE2 tem uma corrente que aumenta com número n de bicamadas ficando evidente portanto, a ocorrência de um efeito sinérgico entre ION e NiTsPc. Experimentos de voltametria cíclica (VC) mostraram que há transferência de carga que ocorre entre ION e NiTsPc através das pontes oxo, e essa transferência é essencial para o bom desempenho do eletrodo para a oxidação de EE2, que foi então quantificado após a otimização dos parâmetros experimentais sendo definido o tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,0 como eletrólito de suporte e o condicionamento do eletrodo por 30 segundos no potencial de -0,6 V. Desta forma, após 7 medidas consecutivas de EE2 10 µmol L<sup>-1</sup> com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10, o coeficiente de variação foi 2,85 %. O método proposto apresentou faixa linear de trabalho de 0,07 a 30 µmol L<sup>-1</sup> e limite de detecção e quantificação de 7,8x10<sup>-9</sup> e 2,4x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> respectivamente. Na análise em água de torneira e água da estação do Lago Paranoá o EE2 não foi detectado, porém apresentou valores de recuperação entre 96,2% e 109,6%, observou-se também que a oxidação do EE2 não foi afetada com a composição de urina sintética. Esses resultados mostram que o método desenvolvido é promissor para a determinação de EE2.

Palavras-chave: etinilestradiol, ftalocianina de níquel(II) tetrassulfonada, nanopartículas de óxido de ferro, voltametria.

## ABSTRACT

This work describes the development of an electroanalytical methodology for the determination of ethinylestradiol (EE2). For this purpose, ITO conducting glass substrates were modified with LbL films of nickel (II) tetrasulfonate phthalocyanine (NiTsPc) and iron oxide nanoparticles (ION) for the construction of the working electrode. The modification was carried out by successive immersion (deposition cycle) of the ITO in the NiTsPc solution and the ION suspension, giving ITO(NiTsPc/ION)-*n* electrodes, where *n* represents the number of deposition cycles or bilayers. Scanning electron microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) showed a rough surface and uniformly covered by nanoparticles. Atomic force microscopy and UV-Vis and Raman spectroscopies suggest that the successive deposition of NiTsPc/ION bilayers forms a porous supramolecular structure driven by both electrostatic interaction and covalent Fe(III)-O-Ni(II) bridges. The ITO(ION/NiTsPc)-*n* electrode was used in the detection EE2 by differential pulse voltammetry (DPV). Initially, it was observed that ITO electrodes modified with ION and NiTsPc separately present a much lower performance in EE2 oxidation that occurs at + 0.8V. In addition, it was verified that the oxidation of EE2 occurs with a current increasing with number *n* of bilayers, thus evidencing the occurrence of a synergistic effect between ION and NiTsPc. Cyclic voltammetry (VC) experiments showed that there is a charge-transfer process occurring between ION and NiTsPc through the oxo bridges, and that transfer is essential for the good performance of the electrode for EE2 oxidation, that was then quantified after the optimization of the experimental parameters and the sodium acetate buffer 0.1 mol L<sup>-1</sup> at pH 4.0 as support electrolyte was defined and the electrode conditioning for 30 seconds at the potential of -0.6 V, the coefficient of variation was 2.85% after seven consecutive measurements of EE2 10 μmol L<sup>-1</sup>. The proposed method presented a linear working range of 0.07 to 30 μmol L<sup>-1</sup> and limit of detection and quantification of 7.8x10<sup>-9</sup> and 2.4x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> respectively. In the analysis of tap water and water treatment plant (Paranoa Lake), EE2 was not detected with the proposed method, but presented recovery values between 96.2% and 109.6%, it was also observed that the EE2 oxidation was not affected with the composition of synthetic urine. These results show that the method developed is promising for the determination of EE2.

Key words: ethinylestradiol, nickel (II) tetrasulfonate phthalocyanine, iron oxide nanoparticles, voltammetry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Estrutura química dos estrogênios. <sup>43</sup> .....	22
<b>Figura 2-</b> Reação de síntese do EE2 a partir da estrona. ....	22
<b>Figura 3-</b> Representação da cela eletroquímica utilizada nas medidas de voltametria. <sup>72</sup> .....	26
<b>Figura 4-</b> (a) Sinal de excitação em voltametria cíclica. (b) Voltamograma cíclico de um processo reversível. <sup>73</sup> .....	26
<b>Figura 5-</b> Voltamogramas de um processo redox quasi-reversível (a) irreversível (b). <sup>73</sup> .....	27
<b>Figura 6-</b> Sinal de excitação em (a) voltametria de pulso diferencial e (b) voltametria de onda quadrada. (c) Voltamograma típico para as duas técnicas. <sup>69</sup> .....	28
<b>Figura 7-</b> Variação da corrente faradáica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso, onde $\tau$ é o período do pulso. <sup>75</sup> .....	29
<b>Figura 8-</b> Representação de (a) célula unitária espinélio de face centrada para Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> e (b) ampliação de um tetraedro e um octaedro adjacente compartilhando um átomo de oxigênio. As esferas maiores representam os átomos de ferro Fe <sup>tet</sup> Fe <sup>oct</sup> sob sub-redes tetraédricas e octaédricas, respectivamente. As esferas menores são os átomos de oxigênio. <sup>83</sup> .....	32
<b>Figura 9-</b> Estrutura de uma metaloftalocianina, M representa o metal. <sup>98</sup> .....	35
<b>Figura 10-</b> Diagrama de energia simplificado para agregados tipo H e tipo J. A seta contínua representam a transição de maior probabilidade e as setas pontilhadas a de menor probabilidade, $\mu$ representa o dipolo induzido da molécula. <sup>104</sup> .....	36
<b>Figura 11-</b> (a) Gotejamento dos sais de Fe(II) e Fe(III) na solução de NaOH (0,9 mol L <sup>-1</sup> ). Nanopartículas de magnetita (b) decantadas e (c) dispersas em HCl, pH 4,0. ....	42
<b>Figura 12-</b> Fórmula estrutural da NiTsPc. <sup>32</sup> .....	44
<b>Figura 13-</b> Representação ilustrativa do preparo dos eletrodos ITO(ION/NiTsPc) pela técnica LbL. ....	45
<b>Figura 14-</b> Eletrodos de ITO(NiTsPc/ION)-n com n = 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17 e 20. ....	46
<b>Figura 15-</b> (a) Substrato de ITO e eletrodos (b) ITO/(PDAC/NiTsPc)-10 e (c) ITO/PDAC(PSS/ION)-10.....	46
<b>Figura 16-</b> Sistema eletroquímico (a) Potenciostato/Galvanostato, (b) Eletrodos i- contra-eletrodo de platina, ii- eletrodo de (NiTsPc/ION)-10 e iii-Eletrodo de referência de Ag/AgCl. ....	49

<b>Figura 17-</b> (a) Imagem de MET das ION e (b) distribuição de tamanhos das nanopartículas, a linha vermelha representa o ajuste com a função log-normal. ....	51
<b>Figura 18-</b> Difratoograma de raios-x das ION. ....	52
<b>Figura 19-</b> Imagens de MEV de (a) filme ITO(NiTsPc/ION)-10 e (b) borda do substrato ITO. ....	54
<b>Figura 20-</b> Espectro de EDX do filme ITO(NiTsPc/ION)-10. ....	55
<b>Figura 21-</b> (a) Imagem de AFM da amostra ITO(NiTsPc/ION)-10, (b) traço de perfil de superfície da visualização ampliada de (a) e (c) imagem 3D da mesma amostra. ....	56
<b>Figura 22-</b> Rugosidade e espessura do filme em função do número de bicamadas de (NiTsPc/ION) depositadas. As barras de erro nos dados de espessura representam o desvio padrão para medições realizadas em três pontos de amostra diferentes. ....	57
<b>Figura 23-</b> Espectros de absorção de UV-vis de (a) solução de NiTsPc, suspensão de ION, filme de (NiTsPc/ION)-10 e (b) dos filmes com 1, 3, 5, 7 e 10 bicamadas de NiTsPc/ION depositadas no quartzo. (c) Relação linear entre absorbância e número de bicamadas depositadas. (d) Razão entre as absorbâncias consideradas para o dímero ( $A_{dim}$ ) e o monômero ( $A_{mon}$ ) de NiTsPc em função do número de bicamadas de NiTsPc/ION. ....	59
<b>Figura 24-</b> Absorbâncias em 360 nm e 620 nm para os diferentes pontos do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 apresentado na imagem fotográfica abaixo do gráfico. ....	60
<b>Figura 25-</b> (a) Espectros de Raman da solução de NiTsPc e do filme de (NiTsPc/ION)-10, obtidos com excitação em 632,8 nm. (b) Modelos propostos para as interações eletrostáticas e covalentes (via ponte oxo) entre NiTsPc e ION no filme de NiTsPc/ION. ....	61
<b>Figura 26-</b> Densidade de corrente de pico anódico para voltamogramas de pulso diferencial de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de EE2 oxidado com eletrodos de ITO modificado com diferentes nanomateriais. O eletrólito de suporte utilizado foi acetato de sódio pH 4,0; amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	63
<b>Figura 27-</b> Voltamogramas cíclicos de (—) tampão acetato de sódio pH 4,5 e (—) EE2 na concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato de sódio pH 4,5, adquiridos com os eletrodos de ITO (a) sem filme e modificados com 10 bicamadas de (b) PSS/ION, (c) PDAC/NiTsPc e (d) NiTsPc/ION. Todos voltamogramas registrados na velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ . ....	64
<b>Figura 28-</b> (a) Voltamograma cíclico do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 adquiridos nas velocidades de varredura de (i) 10 (ii) 25 (iii) 50 (iv) 75 e (v) $100 \text{ mV s}^{-1}$ (b) Variação da densidade de corrente de pico anódico ( $J_{pa}$ ) em função da	



velocidade de varredura ( $v$ ) (c) Gráfico de Tafel na velocidade de $50 \text{ mV s}^{-1}$ (d) Dependência do potencial de pico ( $E_{pa}$ ) em relação a $\ln v$ .....	66
<b>Figura 29-</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com os eletrodos de ITO modificados com (ION/NiTsPc)-10 e (PDAC/PSS/ION/NiTsPc)-10 em (a) eletrólito de suporte tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) em solução de EE2 na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de $50 \text{ mV}$ e velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	67
<b>Figura 30-</b> (a) Voltamograma cíclico eletrodo ITO(ION/NiTsPc)-10 em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 com $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de EE2 adquiridos nas velocidades de varredura de (i) 50 (ii) 75 (iii) 125 (iv) 175 (v) $200 \text{ mV s}^{-1}$ .(b) Variação da densidade de corrente de pico anódico ( $J_{pa}$ ) em função da velocidade de varredura ( $v$ ). (c) Gráfico de Tafel na velocidade de $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (d) Dependência do potencial de pico ( $E_{pa}$ ) em relação a $\ln v$ .....	68
<b>Figura 31-</b> Mecanismo de reação de oxidação do EE2. <sup>149</sup> .....	69
<b>Figura 32-</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 (a) em eletrólito de suporte tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) em solução de EE2 na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de $50 \text{ mV}$ e velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ iniciando a varredura em diferentes potenciais. ....	70
<b>Figura 33-</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodos de (NiTsPc/ION)-10 com última camada de NiTsPc em (i) e de ION em (ii) na solução de EE2 com concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de $50 \text{ mV}$ e velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	71
<b>Figura 34-</b> Espectros de impedância eletroquímica para oxidação de EE2 ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) realizada com ITO, ITO(PSS/ION)-10, ITO(PDAC/NiTsPc)-10 e ITO(NiTsPc/ION)-10 com tampão acetato de sódio, pH 4,5 como eletrólito de suporte, na frequência de 100 MHz a 0,1 Hz e potencial de cela de +0,7 V, a figura inserida mostra os espectros em alta frequência. (b) Resistência de transferência de carga ( $R_2$ ), (c) capacitância da dupla-camada ( $C_1$ ) e de adsorção ( $C_2$ ) determinada para cada eletrodo através do circuito inserido na Figura 34c.....	73
<b>Figura 35-</b> (a) Espectros de impedância eletroquímica para a oxidação de EE2 ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em eletrodos de 1 a 10 bicamadas de NiTsPc/ION com tampão acetato de sódio, pH 4,5 como eletrólito de suporte, na frequência de 100 MHz a 0,1 Hz e potencial de cela de +0,7. O gráfico inserido mostra a resistência de transferência de carga ( $R_2$ ) <i>versus</i> o número de bicamadas. (b) Capacitância da dupla-camada ( $C_1$ ) e de adsorção ( $C_2$ ) em função do número de bicamadas.	74

<b>Figura 36-</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com (a) ITO(NiTsPc/Mgm)-10 (i), ITO(NiTsPc/ION)-10 (ii), ITO(NiTsPc/Mgn)-10 (iii), SPCE (iv) e SPCE(NiTsPc/Mgn)-10 (v), (b) ITO(NiTsPc/ION)-10 preparados com ION 1 g L <sup>-1</sup> e 6,4 g L <sup>-1</sup> , (c) com tempos de imersão de 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min e 10 min e (d) com 1, 3, 5,10, 15 e 20 bicamadas em EE2 na concentração de 10 μmol L <sup>-1</sup> com tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de 10 mV s <sup>-1</sup> .....	76
<b>Figura 37-</b> Comparação entre as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ) na oxidação do EE2 na concentração de 10 μmol L <sup>-1</sup> com o eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10, utilizando tampão acetato de sódio, 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 4 como eletrólito de suporte em velocidade de varredura de 10 mV s <sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 50 mV. ....	77
<b>Figura 38-</b> Influência do pH na densidade da corrente de pico anódico (●) e potencial de pico anódico (■) para a oxidação de 10 μmol L <sup>-1</sup> do EE2 usando tampão RB na concentração de 0,1 mol L <sup>-1</sup> como o eletrólito de suporte, adquirido com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em velocidade de varredura de 10mV s <sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 50 mV. ....	78
<b>Figura 39-</b> (a) Densidade de corrente de pico anódico e (b) Voltamogramas de pulso diferencial para 10 μmol L <sup>-1</sup> de EE2 oxidado com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em diferentes eletrólitos de suporte com amplitude de pulso 50 mV e velocidade de varredura de 10 mV s <sup>-1</sup> .....	79
<b>Figura 40-</b> (a) Densidades de corrente de pico de oxidação do EE2 em função do potencial de condicionamento e (b) Voltamograma de pulso diferencial da primeira leitura, segunda leitura e após a realização do condicionamento por 60 segundos a -0,6 V do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em EE2 na concentração de 10 μmol L <sup>-1</sup> em tampão acetato de sódio pH 4,0, com amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de 10 mV s <sup>-1</sup> .....	80
<b>Figura 41-</b> Densidade de corrente de pico anódico e largura a meia altura do pico (W <sub>1/2</sub> ) em função da (a) velocidade de varredura e (c) da amplitude de pulso. Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes (b) velocidades de varredura e (d) amplitudes de pulso obtidos com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em solução de EE2 na concentração de 10 μmol L <sup>-1</sup> usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte.....	82
<b>Figura 42-</b> (a) Densidade de corrente de pico anódico em função do (a) potencial de acumulação aplicado por 30 segundos (b) tempo de acumulação com potencial aplicado de 0,3 V no eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 em solução de EE2 na concentração de 10 μmol L <sup>-1</sup> , usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de 30 mV s <sup>-1</sup> .....	83

<b>Figura 43-</b> Voltamograma de pulso diferencial antes e após a purga com N <sub>2</sub> por 180 segundos, registrados com eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 em solução de EE2 na concentração de 10 μmol L <sup>-1</sup> , usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de 30 mV s <sup>-1</sup> .....	84
<b>Figura 44-</b> (a) Voltamograma de pulso diferencial de 7 medidas consecutivas EE2 na concentração de 10 μmol L <sup>-1</sup> adquirido com o eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, velocidade de varredura de 30 mV s <sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 50 mV, (b) Densidade de corrente de pico anódico em função do número de medidas. ....	85
<b>Figura 45-</b> (a) Voltamograma de pulso diferencial do EE2 nas concentrações de (i) 0,07; (ii) 0,5; (iii) 0,9; (iv) 1,7; (v) 3,3; (vi) 4,9; (vii) 6,5; (viii) 8,1; (ix) 9,7; (x) 11,3 μmol L <sup>-1</sup> e (b) nas concentrações de (xi) 10; (xii) 14; (xiii) 22; (xiv) 26; (xv) 30 μmol L <sup>-1</sup> adquiridos com eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, velocidade de varredura de 30 mV s <sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 50 mV. ....	86
<b>Figura 46-</b> Estruturas químicas do triclosan e bisfenol A .....	88
<b>Figura 47-</b> (a) Voltamograma de pulso diferencial da amostra coletada na estação de tratamento do Lago Paranoá com adição de EE2 nas concentrações de (1) 2 μmol L <sup>-1</sup> , (2) 2,4 μmol L <sup>-1</sup> , (3) 3,6 μmol L <sup>-1</sup> e (4) 4,8 μmol L <sup>-1</sup> , (b) J <sub>pa</sub> versus concentração de EE2 adicionada. (c) Voltamograma de pulso diferencial para EE2 (10 μmol L <sup>-1</sup> ) em tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte e urina sintética, registrados com eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10, velocidade de varredura de 30 mV s <sup>-1</sup> e amplitude de pulso de 50 mV. A linha tracejada representa a linha de base utilizada para determinas J <sub>pa</sub> .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Grupo de desreguladores endócrinos com suas subclasses, exemplos e fontes. <sup>19,20</sup>	20
<b>Tabela 2-</b> Eletrodos modificados com nanopartículas de óxido de ferro .....	34
<b>Tabela 3-</b> Eletrodos modificados com metaloftalocianinas.....	37
<b>Tabela 4-</b> Regentes utilizados.....	39
<b>Tabela 5-</b> Porcentagem em massa e átomos dos elementos presentes no filme ITO(NiTsPc/ION)-10. ....	55
<b>Tabela 6-</b> Atribuições das bandas dos espectros de Raman para a solução de NiTsPc e o filme (NiTsPc/ION)-10. ....	62
<b>Tabela 7-</b> Parâmetros experimentais de voltametria de pulso diferencial. ....	84
<b>Tabela 8-</b> Comparação de limites de detecção e faixa linear de trabalho de diferentes eletrodos modificados para a quantificação de EE2.....	87
<b>Tabela 9-</b> Teste de recuperação de EE2 em amostras de água. ....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>USEPA</b>	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
<b>EDC</b>	Desregulador endócrino
<b>EE2</b>	Etinilestradiol
<b>ION</b>	Nanopartículas de óxido de ferro
<b>NiTsPc</b>	Ftalocianina de níquel(II) tetrasulfonada
<b>PBDE</b>	Retardantes de chama bromados
<b>PFOS</b>	Perfluorooctano sulfonatos
<b>PCF</b>	Pentaclorofenol
<b>DBCP</b>	Dibromocloropropano
<b>DDT</b>	Dicloro-difenil-tricloroetano
<b>DES</b>	Dietilestilbestrol
<b>ABES/SP</b>	Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental do Estado de São Paulo
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de diodos
<b>UHPLC</b>	Cromatografia líquida de ultra performance
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>VC</b>	Voltametria Cíclica
<b><math>E_{pc}</math></b>	Potencial de pico catódico
<b><math>E_{pa}</math></b>	Potencial de pico anódico
<b><math>I_{pc}</math></b>	Corrente de pico catódico
<b><math>I_{pa}</math></b>	Corrente de pico anódico
<b>VPD</b>	Voltametria de pulso diferencial
<b>IUPAC</b>	União Internacional da Química Pura e Aplicada
<b>FTO</b>	Óxido de estanho dopado com flúor
<b>Chi</b>	Quitosana
<b>MWCNT</b>	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
<b>SWCNT</b>	Nanotubos de carbono de parede simples
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>VOQ</b>	Voltametria de onda quadrada
<b>Lac</b>	Lacase

<b>C-dot</b>	Pontos quânticos de carbono
<b>SNs</b>	Nanopartículas de sílica
<b>GCE</b>	Eletrodo de carbon vítreo
<b>Pc</b>	Ftalocianinas
<b>MPc</b>	Metaloftalocianinas
<b>PDAC</b>	Hidrocloreto de poli(dialildimetil amônio)
<b>PSS</b>	Poliestireno sulfonado
<b>ITO</b>	Índio dopado com óxido de estanho
<b>LABPOLN</b>	Laboratório de pesquisa em polímeros e nanomateriais
<b>LbL</b>	Camada por camada
<b>n</b>	Número de bicamadas depositadas
<b>J</b>	Densidade de corrente
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>EDX</b>	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
<b>CAESB</b>	Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal
<b>AQUAA</b>	Laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental
<b>LQAA</b>	Laboratório de Química e Química Ambiental
<b>AOAC</b>	Associação Oficial de Químicos Analíticos
<b>rGO</b>	Óxido de Grafeno reduzido
<b>CQ</b>	Catequol
<b>HQ</b>	Hidroquinona
<b>RB</b>	Robinson-Britton
<b>np-Mgm</b>	Nanopartículas de Maguemita
<b>np-Mgn</b>	Nanopartículas de Magnetita
<b>np-Ce</b>	Nanopartículas de óxido de Cério
<b>np-Au-Cit</b>	Nanopartículas de Ouro com Citrato
<b>np-Au-PEI</b>	Nanopartículas de Ouro com Polímero ramificado poli(etileno imina)
<b>CPB</b>	Brometo de Cetil Piridina
<b>HRP</b>	Enzima Peroxidase
<b>SAE-CTAB</b>	Eletrodo Sólido de Amálgama- Brometo de Cetiltrimetilamônio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
3.1 Desreguladores endócrinos .....	20
3.1.1 <i>Etinilestradiol</i> .....	22
3.2 Métodos de determinação de etinilestradiol .....	24
3.3 Voltametria .....	25
3.3.1 <i>Voltametria Cíclica</i> .....	26
3.3.2 <i>Voltametria de pulso diferencial</i> .....	27
3.4 Eletrodos quimicamente modificados para a determinação de etinilestradiol .....	29
3.4.1 <i>Nanopartículas de óxido de ferro</i> .....	31
3.4.2 <i>Ftalocianinas</i> .....	34
3.4.3 <i>Eletrodos modificados com nanopartículas de óxido de ferro e ftalocianinas</i> .....	37
3.5 Validação de métodos analíticos .....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1 Reagentes e soluções .....	39
4.2 Limpeza das vidrarias .....	40
4.3 Preparação dos eletrodos modificados.....	41
4.3.1 <i>Limpeza do substrato de vidro condutor</i> .....	41
4.3.2 <i>Preparo das nanopartículas de óxido de ferro e da ftalocianina</i> .....	41
4.3.3 <i>Deposição dos filmes sobre vidro condutor via LbL</i> .....	44
4.4 Caracterização estrutural das nanopartículas de óxido de ferro e dos filmes .....	47
4.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria cíclica e de pulso diferencial .....	48
4.6 Parâmetros de validação de metodologia .....	50
4.7 Análise de amostras de água e urina sintética.....	50
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	51
5.1 Caracterização das nanopartículas de óxido de ferro .....	51
5.2 Caracterização morfológica e estrutural do filme NiTsPc/ION .....	53

5.2.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de raios X por dispersão de energia</i> .....	53
5.2.2 <i>Microscopia de força atômica</i> .....	55
5.2.3 <i>Espectros de absorção no UV-vis</i> .....	57
5.2.4 <i>Espectroscopia Raman</i> .....	60
5.3 <b>Escolha do eletrodo de trabalho</b> .....	62
5.4 <b>Identificação e caracterização dos processos eletroquímicos</b> .....	63
5.4.1 <i>Espectroscopia de impedância eletroquímica</i> .....	71
5.5 <b>Otimização do eletrodo de NiTsPc/ION</b> .....	75
5.6 <b>Otimização das condições experimentais para quantificação do EE2</b> .....	77
5.6.1 <i>Escolha da técnica eletroanalítica</i> .....	77
5.6.2 <i>Efeito do pH na oxidação de EE2</i> .....	77
5.6.3 <i>Eletrólito de suporte e condicionamento do eletrodo</i> .....	78
5.6.4 <i>Velocidade de varredura e amplitude de pulso</i> .....	81
5.6.5 <i>Potencial e tempo de acumulação</i> .....	82
5.7 <b>Validação da metodologia</b> .....	84
5.7.1 <i>Estudos de interferência e aplicação analítica</i> .....	88
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	91
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	92
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	93
<b>9. ANEXOS</b> .....	102
9.1 <b>Imagens 2D e 3D de microscopia de força atômica do filmes (NiTsPc/ION) com diferentes números de bicamadas</b> .....	102
9.2 <b>Artigos publicados</b> .....	104



## 1. INTRODUÇÃO

A presença de desreguladores endócrinos no meio ambiente por exemplo na água, sedimentos, peixes e em vários bens de consumo como plásticos e produtos de cuidados pessoais, é uma preocupação para a saúde humana. Por isso, eles têm sido alvo de diversas pesquisas sobre como atuam no organismo e metodologias analíticas para sua detecção em diversas amostras.<sup>1,2</sup>

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), um desregulador endócrino (EDC, do inglês Endocrine Disrupting Chemical) é um “agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos”.<sup>3</sup>

Essas espécies, portanto, afetam o sistema endócrino e dentre elas estão substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bisfenol A, parabenos, algumas classes de fármacos, entre outras) e substâncias naturais (hormônios naturais e fitoestrogênios).<sup>4</sup>

Existem relatos que associam a exposição aos EDC ao câncer de testículo<sup>5</sup>, de mama<sup>6</sup> e de próstata<sup>7</sup>, ao declínio das taxas de espermatozoides<sup>5</sup>, endometriose<sup>8</sup>, infertilidade<sup>9</sup>, disfunção da tireóide<sup>10</sup> e neurotoxicidade<sup>11</sup>. Os hormônios, por exemplo, podem provocar efeitos adversos em níveis na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  como o etinilestradiol (EE2) que é um hormônio sintético com efeito similar ao do estrogênio natural estradiol.<sup>12,13</sup>

As formulações contraceptivas orais mais utilizadas contêm EE2. Em contraste com o estradiol, o EE2 é resistente à degradação pelo fígado; portanto, uma grande quantidade de EE2 e seus derivados são introduzidos no meio ambiente por meio da urina e das fezes.<sup>14</sup>

Uma importante forma de exposição humana a esse composto é a água. Apesar de evidências quanto à nocividade, ainda não existem regulamentos nacionais ou internacionais, com o estabelecimento de concentrações máximas permissíveis, para este composto na água de consumo humano.<sup>15</sup>

Neste contexto, tem-se despertado o interesse da comunidade científica no desenvolvimento de métodos confiáveis para a determinação de EE2. Dentre as técnicas utilizadas com essa finalidade destacam-se a cromatografia líquida<sup>16</sup> e gasosa<sup>17</sup> com detecção de espectrometria de massa, espectroscopia de fluorescência<sup>18</sup> e a voltametria.<sup>19,20</sup>

As técnicas voltamétricas apresentam diversas vantagens, tais como baixo custo e tempo de medida, facilidade de operação, portabilidade e pouca geração de resíduos. Apesar disso, um

desafio para o seu uso é garantir a seletividade em amostras complexas e em determinações simultâneas de mais de dois compostos orgânicos, devido à sobreposição de potencial de redução ou oxidação de diversas espécies químicas.<sup>21,22</sup>

Então, as pesquisas têm focado no aprimoramento, em particular, no uso de eletrodos modificados com nanoestruturas que proporcionem maior sensibilidade e seletividade, como por exemplo nanopartículas metálicas<sup>23</sup>, compostos orgânicos<sup>24</sup>, nanoestruturas de carbono<sup>25</sup>, anticorpos<sup>26</sup>, enzimas<sup>27</sup> dentre outros.

Diante do exposto, esse trabalho propõe a modificação de eletrodos com nanopartículas de óxido de ferro (ION) e ftalocianina de níquel(II) tetrasulfonada (NiTsPc) para a determinação eletroquímica de EE2 em amostras de água e urina. A escolha por estes dois materiais se deve às suas atividades eletrocatalíticas para diferentes analitos, custo baixo e possibilidade de processamento na forma de filmes ultrafinos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral, desenvolver e validar um método eletroanalítico, utilizando eletrodos modificados com ION e NiTsPc para a determinação do hormônio EE2, em amostras de água e urina sintética.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver metodologia para a modificação controlada dos eletrodos com ION e NiTsPc.
- Realizar um estudo eletroquímico desses eletrodos para avaliar os processos de oxidação e redução envolvidos na arquitetura do filme.
- Otimizar os parâmetros da voltametria de pulso diferencial para obtenção de melhor resposta do método.
- Validar a metodologia desenvolvida para a determinação de EE2.
- Avaliar o efeito de amostras de água e urina sintética na detecção de EE2.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Desreguladores endócrinos

Os desreguladores endócrinos (EDC) são uma categoria de poluentes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino, responsável pelo desenvolvimento, crescimento, reprodução e comportamento de seres humanos e de animais.<sup>28</sup> Segundo a União Europeia, essa interferência pode ocorrer com os EDC imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo sistema endócrino, bloqueando receptores hormonais e afetando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção de hormônios.<sup>4,29</sup>

Alguns produtos químicos podem afetar a função da tireóide, o sistema imunológico e também podem ter alguma neurotoxicidade, embora os mecanismos pelos quais esses efeitos possam ocorrer ainda não tenham sido elucidados. Além disso, os EDC podem contribuir para má formação congênita em crianças, cânceres relacionados a hormônios de mulheres (mama e ovário) e homens (testículos e próstata) e desenvolvimento sexual retardado.<sup>5-7,9-11</sup>

A Tabela 1 mostra exemplos de EDC e suas principais fontes que levam à contaminação ambiental.

**Tabela 1-**Grupo de desreguladores endócrinos com suas subclasses, exemplos e fontes.<sup>30,31</sup>

<b>Grupo</b>	<b>Subclasses</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Fontes</b>
Desreguladores Endócrinos	Produtos Químicos Industriais	Alquifenóis, bisfenol A, ftalatos, estireno, retardantes de chama bromados (PBDE), surfactantes (perfluorotano sulfonatos - PFOS)	Esgotos domésticos e efluentes industriais
	Hormônios	Estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol, etinilestradiol	Esgoto doméstico e criadouros de animais confinados
	Agrotóxicos	PCF (pentaclorofenol), rifuralin, atrazina, DBCP (dibromocloropropano), lindano	Esgoto doméstico, escoamento superficial em áreas agrícolas.

A desregulação endócrina não é um fenômeno novo. Na década de 1930, estudos envolvendo animais de laboratório demonstraram propriedades de estrogênios (hormônios sexuais femininos) de vários produtos químicos industriais, incluindo o bisfenol A, amplamente utilizado em plásticos, resinas e selantes dentários.<sup>12,32</sup>

O efeito feminilizante do pesticida DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) em galos foi relatado na década de 1950. Em 1971, médicos traçaram uma epidemia de carcinoma de células vaginais em mulheres jovens que usaram um estrogênio sintético, o dietilestilbestrol (DES), durante a gravidez. Esse estrogênio era utilizado com a finalidade de evitar o aborto espontâneo na mulher.<sup>29,33,34</sup>

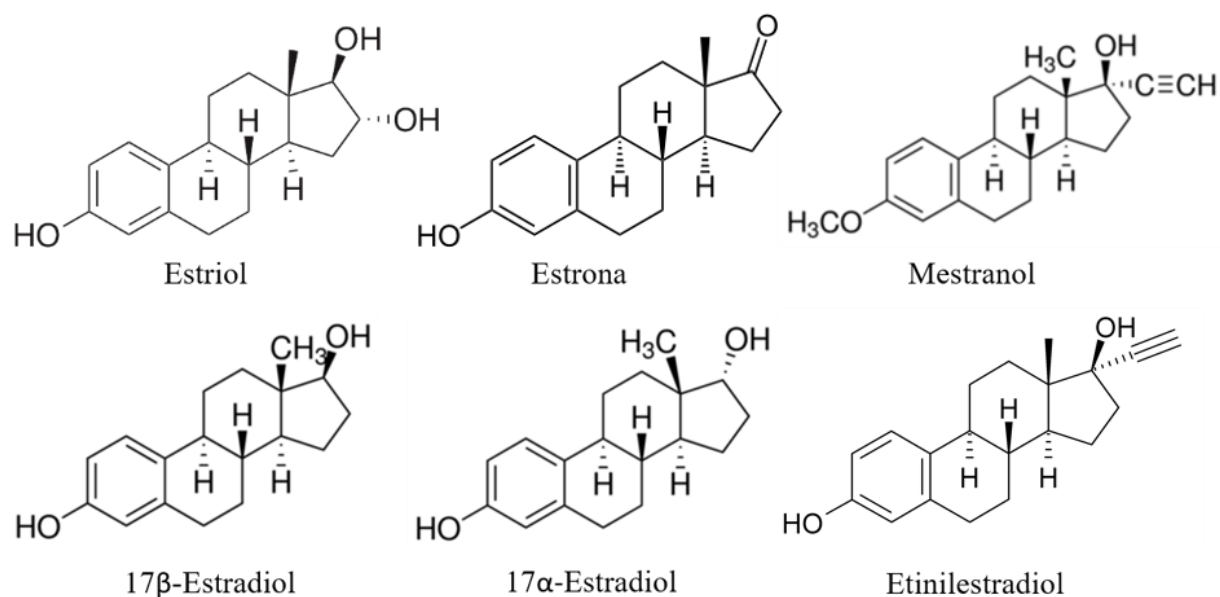
Dada a diversidade de estruturas químicas e propriedades dos EDC e seus metabólitos, não é possível fazer generalizações sobre o seu comportamento e o destino no meio ambiente. Sabe-se, contudo, que os recursos hídricos podem ser contaminados tanto por águas residuárias descartadas sem tratamento, de origem doméstica, hospitalar ou industrial, quanto por efluentes de estações com baixa ou moderada eficiência de remoção.<sup>35,36</sup>

Além disso, os EDC podem atingir corpos d'água via lançamento de lixiviados de aterro e drenagens superficiais agrícolas como foi mostrado na Tabela 1. No Brasil não existe legislação para a maioria dos EDC em água de consumo humano, importante fonte de exposição humana a estes poluentes. Os limites máximos permitidos são estabelecidos apenas para alguns agrotóxicos que consta na portaria nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011.<sup>37</sup>

A Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental do Estado de São Paulo (ABES/SP) publicou, em 2012, o documento intitulado Guia de Potabilidade para Substâncias Químicas, em que foi gerada uma lista composta por 291 substâncias prioritárias presentes na água, ainda não regulamentadas. Esses compostos foram priorizados conforme o uso, quantidades produzidas, persistência e tipos de efeitos que causam baseados na literatura. Alguns EDC foram incluídos na lista geral, entretanto, após a combinação das prioridades citadas, alguns deles foram excluídos da lista principal como os hormônios.<sup>38,39</sup>

Contudo, vale destacar que alguns EDC fazem parte de listas de substâncias prioritárias de algumas agências internacionais, como, por exemplo, os estrógenos 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, estrona, etinilestradiol e mestranol (Figura 1), considerados pela USEPA contaminantes orgânicos de água potável que requerem regulamentação.<sup>40</sup>

A Comissão Europeia por exemplo, limita as concentrações médias de EE2 em águas superficiais a não mais que 0,035 ng L<sup>-1</sup>, para o estradiol e a estrona o limite estabelecido é de 0,4 ng L<sup>-1</sup>.<sup>41,42</sup> O etinilestradiol foco deste trabalho será abordado no tópico seguinte.

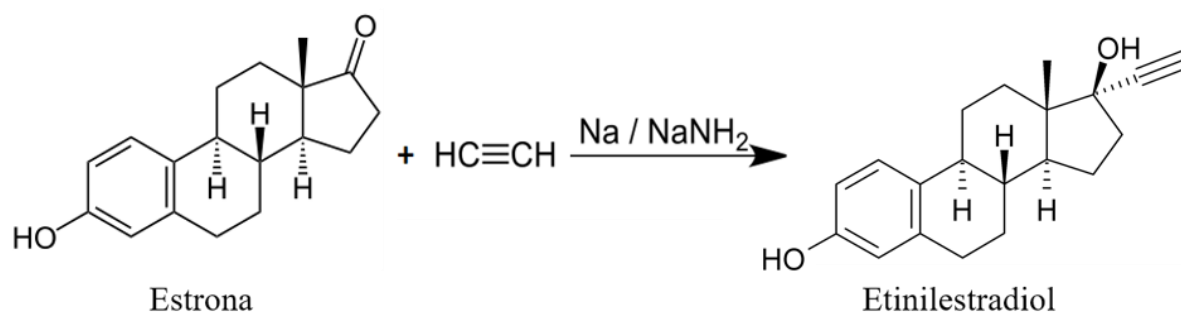


**Figura 1-** Estrutura química dos estrogênios.<sup>43</sup>

### 3.1.2 Etinilestradiol

O etinilestradiol ou 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) é o principal componente estrogênico utilizado em formulações de contraceptivos orais, sendo um dos mais consumidos no mundo.<sup>39</sup>

Imhoffer e Hohlwer em 1938, sintetizaram o EE2 pela primeira vez com etinilação do estrogênio natural estrona, processo este a base de etino (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), sódio (Na) e amida de sódio (NaNH<sub>2</sub>), conforme a reação apresentada na Figura 2.<sup>44,45</sup>



**Figura 2-** Reação de síntese do EE2 a partir da estrona.

O EE2 tem efeito estrogênico comparável à do estrogênio natural 17 $\beta$ -Estradiol sendo um dos estrogênios mais potentes e que pode provocar efeitos adversos à saúde, tais como coagulação acelerada, fibrinólise e aumento do risco de trombose venosa no uso em contraceptivos hormonais combinados.<sup>46</sup> Portanto, a exposição não intencional da população,

especialmente de embriões em desenvolvimento, meninos e meninas na pré-puberdade, deve ser evitada.<sup>47-49</sup>

O uso de águas superficiais para o consumo humano, bem como a transformação de seus mananciais como receptores de esgotos sanitários tratados ou não, tem sido um dos principais motivos de preocupação acerca da exposição humana ao EE2 que pode ser excretado até 68 % na urina ou nas fezes, sendo mais persistente no ambiente do que os estrogênios naturais.<sup>50-53</sup>

No Brasil, estudos já mostram a presença de EE2 na água. Moreira et al.<sup>54</sup> utilizando cromatografia líquida acoplada a uma espectrômetro de massa (HPLC-MS) detectaram concentrações na faixa de 3 a 54 ng L<sup>-1</sup> na represa Vargem das Flores, responsável por cerca de 10% do abastecimento de água da região metropolitana de Belo Horizonte. Sodré et al.<sup>55</sup> determinaram a concentração de EE2 no rio Jundiá e no rio Atibaia, sendo este último utilizado para captação de água no estado de São Paulo, as concentrações foram entre 6 e 310 ng L<sup>-1</sup>, a quantificação foi realizada com HPLC.

Torres et al.<sup>56</sup> determinaram EE2 no rio Piracicaba em São Paulo utilizando HPLC-MS, quando encontraram EE2 na faixa de 26 a 150 ng L<sup>-1</sup>. Em águas superficiais da região metropolitana de São Paulo, Coelho et al.<sup>57</sup> quantificaram EE2 na concentração de 120 ng L<sup>-1</sup> a 1200 ng L<sup>-1</sup> utilizando HPLC-MS, a maior concentração foi encontrada no córrego Tubarão, que recebe efluente de uma estação de tratamento de esgoto.

No Paraná, a presença de EE2 foi detectada na bacia do rio Iguaçu por HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD). A concentração de EE2 encontrada variou entre 120 e 5900 ng L<sup>-1</sup> nos diferentes pontos avaliados. Cerca de 25% da população do estado do Paraná vive com baixo nível de taxas de tratamento de esgoto.<sup>58</sup>

Em Brasília, até a data da pesquisa (Setembro de 2020), apenas dois artigos foram publicados quanto a presença de EE2 em água. Em um as amostras coletadas foram de água potável e não foi identificada a presença desse estrogênio em 10 amostras.<sup>59</sup> Em outro estudo, avaliou-se água potável de 7 diferentes pontos e foi identificado a presença de EE2 na concentração de 4,47±0,07 ng L<sup>-1</sup> na amostra coletada na estação de tratamento de água do Lago Paranoá, o método utilizado foi extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra performance acoplada a detector de massas de alta resolução (UHPLC-MS).<sup>60</sup> Contudo, é evidente a necessidade de mais estudos tanto nas estações de tratamento quanto nos rios e lagos presentes neste território.

A introdução do EE2 em ambientes aquáticos pode ser realizada além de disposição inadequada de esgoto sanitário, por meio de resíduos industriais, como também pelo uso de

lodo ativado de estação de tratamento de esgoto na agricultura. Os tratamentos convencionais de água e de esgoto sanitário não são capazes de remover completamente esse estrogênio, que permanece no meio aquático.<sup>15,36,51</sup>

Deve-se considerar também a tendência do EE2 a adsorver sobre matéria orgânica, acumular-se em sedimentos e concentrar-se em organismos de ambientes aquáticos, sendo que esse estrogênio pode provocar feminização anatômica de peixes, comprometendo todo o sistema reprodutivo, atraso da maturidade sexual e diminuição das características sexuais secundárias mesmo em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$ ).<sup>61,62</sup>

Além dos peixes, o EE2 também já foi encontrado em leite, camarão e carnes de porco, vaca e frango com a técnica de UHPLC-MS. No leite, a concentração variou entre 990 e 1660  $\text{ng L}^{-1}$  e nas carnes ficou na faixa de 240 a 910  $\text{ng L}^{-1}$ .<sup>63</sup> Portanto, a presença desse estrogênio em animais pode trazer efeitos adversos à saúde humana, especialmente no que se refere ao consumo de proteínas, na maioria das vezes feito por meio da alimentação com carnes.

A determinação de estrogênios em amostras de urina também é importante para monitorar a ação e o mau funcionamento das glândulas endócrinas, e conseqüentemente o diagnóstico de distúrbios endócrinos que geralmente estão associados a doenças como câncer de mama<sup>6</sup>, anorexia nervosa<sup>64</sup> e pseudo-hermafroditismo<sup>65</sup>. Além disso, pode-se monitorar terapia de reposição hormonal e detectar a puberdade precoce.<sup>66</sup>

### 3.2 Métodos de determinação de etinilestradiol

A técnica mais utilizada para determinação de EE2 é a cromatografia como mostrado no tópico anterior. De fato, o método indicado pela Comissão Europeia para quantificação de EE2 na água é a extração em fase sólida e análise com cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (LC-MS-MS). Técnicas espectroscópicas também podem ser utilizadas como absorção no UV-vis e fluorescência.<sup>18,29,67</sup>

Essas técnicas permitem o desenvolvimento de métodos sensíveis, mas apresentam algumas limitações, como o consumo de tempo, necessidade de grandes volumes de reagentes e equipamentos caros, o que impossibilita análises rápidas no local de interesse.<sup>14</sup>

No Brasil, não existe um método oficial para determinação de EE2. Os métodos utilizados em laboratórios clínicos para esta determinação baseiam-se geralmente na aplicação de metodologias de radioimunoensaio, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e eletroquimioluminescência. No entanto, esses



métodos apresentam alguns inconvenientes, tais como a falta de sensibilidade e precisão das medições, tempo de análise prolongada e o elevado consumo de reagentes, assim como a geração de rejeitos contaminados de difícil tratamento e descarte.<sup>68</sup>

Em razão à crescente necessidade de identificação e quantificação de analitos de maneira rápida, específica e em concentrações cada vez menores tem se intensificado as pesquisas com técnicas eletroquímicas que, além disso, permitem a construção de dispositivos portáteis, de menor custo, uso de menores quantidades de reagentes e possibilitam o monitoramento rápido de substâncias diretamente no campo e em tempo real (*in situ / in loco*).

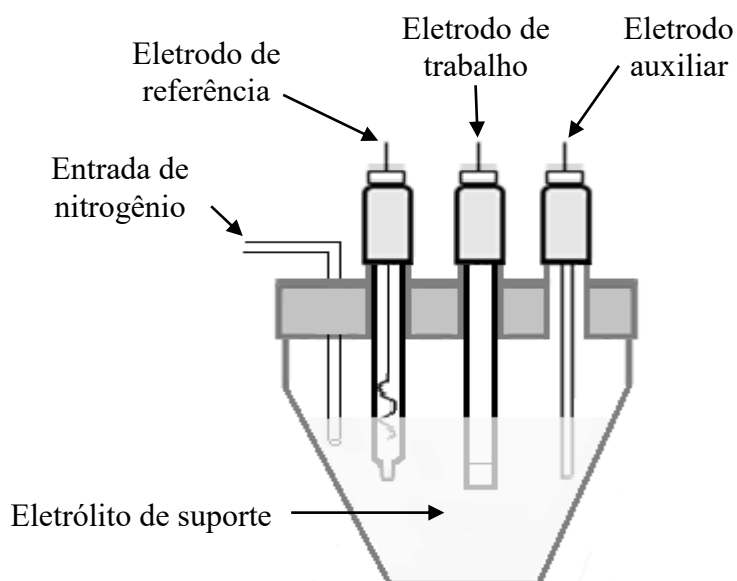
Dentre as técnicas eletroquímicas, as voltamétricas têm se destacado por permitir identificar as reações que ocorrem no eletrodo e alcançar baixos limites de detecção. Alguns aspectos teóricos dessas técnicas serão discutidos a seguir.

### 3.3 Voltametria

A voltametria abrange um conjunto de técnicas que, em geral, medem a corrente proveniente de processos de oxidação e redução na superfície de um eletrodo de trabalho. O potencial é aplicado em relação a um eletrodo de referência, enquanto a corrente resultante passa do eletrodo de trabalho para o eletrodo auxiliar onde é então medida.<sup>69,70</sup>

Os processos de transporte de massa para a superfície do eletrodo de trabalho podem ser por migração sob a influência de um campo elétrico, convecção resultante de agitação, vibração, diferença de temperatura ou densidade e difusão em razão de qualquer diferença de concentração entre a superfície do eletrodo e o seio da solução, em que as espécies químicas deslocam-se de regiões de concentrações altas para regiões de concentrações baixas. Para análise quantitativa a corrente proveniente do processo de difusão é diretamente proporcional a concentração do analito na solução.<sup>69,71</sup>

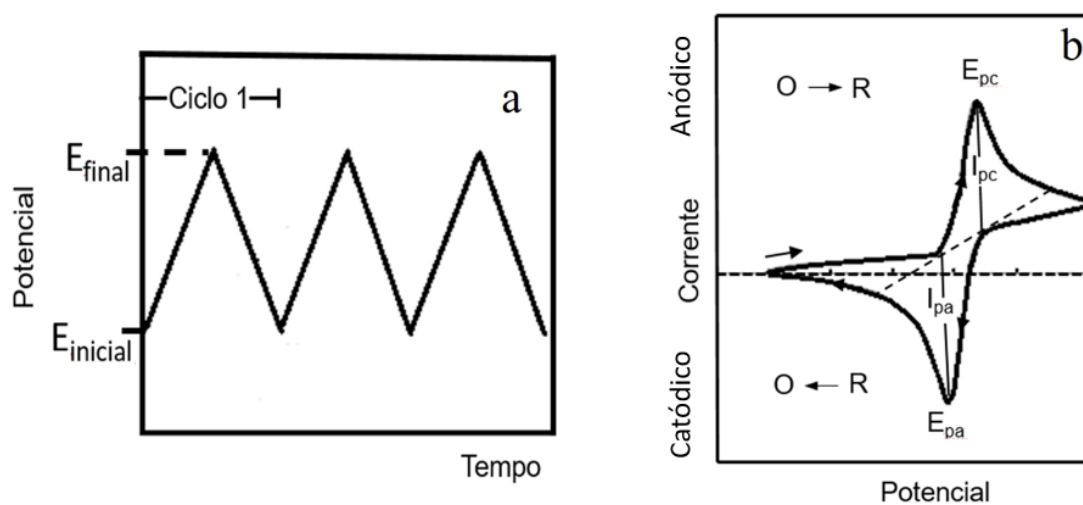
Na voltametria é utilizada uma cela eletroquímica (Figura 3) onde os eletrodos de trabalho, de referência e auxiliar estão imersos no eletrólito de suporte inerte, necessário nos experimentos para diminuir a resistência da solução, eliminar os efeitos de eletromigração e manter uma força iônica constante. Em alguns casos é necessário borbulhar a solução com nitrogênio na solução para retirada de oxigênio que é eletroativo e produz duas ondas na região catódica dos voltamogramas localizadas em potenciais entre -0,050 V e -1,000 V vs ESC, dependendo do pH e do material do eletrodo de trabalho, interferindo assim nas medidas.<sup>69,72</sup>



**Figura 3-** Representação da célula eletroquímica utilizada nas medidas de voltametria.<sup>73</sup>

### 3.3.1 Voltametria Cíclica

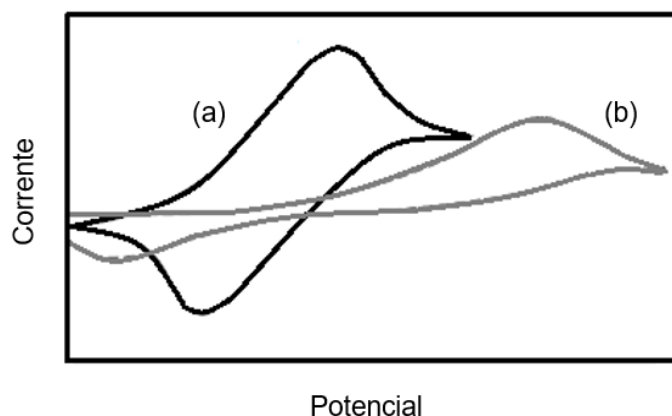
A voltametria cíclica (VC) é geralmente aplicada no estudo de reações redox, com localização rápida de potenciais de redução e oxidação das espécies eletroativas, cinética de transferência de elétrons em reações heterogêneas, detecção de intermediários da reação e processos de adsorção de compostos nos eletrodos. Na VC o sinal de excitação (Figura 4a) varia de forma linear em função do tempo, formando uma onda triangular, com varredura entre dois potenciais do eletrodo, chamados de potenciais de inversão.<sup>69,74</sup>



**Figura 4-** (a) Sinal de excitação em voltametria cíclica. (b) Voltamograma cíclico de um processo reversível.<sup>74</sup>

Os parâmetros eletroquímicos mais importantes de um voltamograma cíclico são os potenciais de pico catódico e anódico ( $E_{pc}$  e  $E_{pa}$ ) e as correntes de pico catódico e anódico ( $I_{pc}$  e  $I_{pa}$ ), essenciais para caracterizar os processos redox ocorridos. A partir desses parâmetros é possível definir se o processo é reversível, quasi-reversível ou irreversível. Para processos reversíveis, no voltamograma cíclico apresentado na Figura 4b as principais características são:  $E_{pa}-E_{pc} \approx 0,059/n$  V, em que  $n$  é o número de elétrons transferidos e  $I_{pa}/I_{pc} = 1$ .<sup>75</sup>

No geral, os voltamogramas de sistemas quasi-reversíveis e irreversíveis, apresentados na Figura 5, exibem uma maior separação em potenciais de pico comparada com um sistema reversível, uma vez que a transferência de elétrons é mais lenta na superfície do eletrodo (processos irreversíveis) e ocasiona um aumento na separação entre os potenciais de pico anódico e catódico e menores correntes de pico.<sup>74,75</sup>



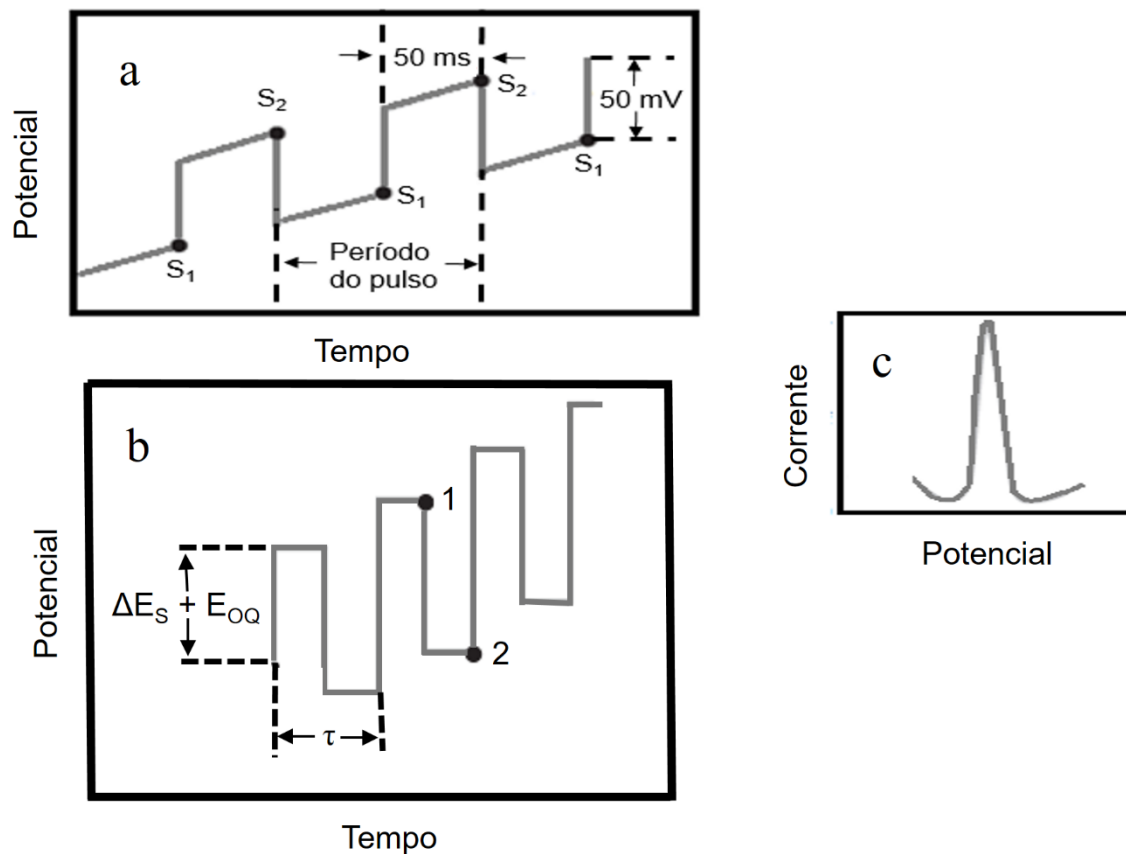
**Figura 5-** Voltamogramas de um processo redox quasi-reversível (a) irreversível (b).<sup>74</sup>

### 3.3.2 Voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada

A Figura 6a mostra o sinal de excitação empregado na voltametria de pulso diferencial (VPD). Este envolve a combinação da aplicação de um pulso sobre uma varredura em forma de escada, onde um pequeno pulso, tipicamente de 50 mV, é aplicado durante os últimos 50 ms. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso ( $S_1$ ) e no fim do pulso ( $S_2$ ), enquanto a diferença entre as duas correntes é registrada.<sup>69,70</sup>

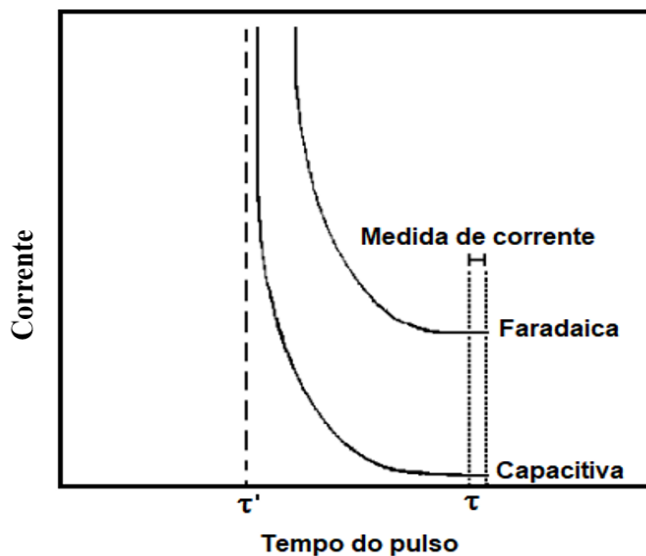
A voltametria de onda quadrada (VOQ) oferece como principal vantagem a grande velocidade, o sinal de excitação para essa técnica é mostrado na Figura 6b, em que o período dos pulsos ( $\tau$ ) são idênticos e, usualmente, cerca de 5 ms, o potencial de cada degrau da escada  $\Delta E_s$  é tipicamente de 10 mV e a grandeza do pulso  $2E_{OQ}$  geralmente é de 50 mV, nessas condições, que correspondem a uma frequência de pulso de 200 Hz, uma varredura de 1 V

requer 0,5 s. A corrente medida é a diferença entre a corrente observada no ponto 1 e a corrente no ponto 2. Como resultado para a VPD e VOQ é obtida uma curva com um pico (Figura 6c), onde sua altura é diretamente proporcional a concentração do analito de interesse.<sup>69</sup>



**Figura 6-** Sinal de excitação em (a) voltametria de pulso diferencial e (b) voltametria de onda quadrada. (c) Voltamograma típico para as duas técnicas.<sup>69</sup>

A sensibilidade da VPD e VOQ é maior que da voltametria cíclica, geralmente, dependendo do eletrodo utilizado os limites de detecção é da ordem de  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, sendo portanto amplamente utilizadas na quantificação de componentes traços de uma amostra. Essa maior sensibilidade ocorre devido a diferença na variação da corrente capacitiva que é proveniente de fenômenos relacionados à dupla camada elétrica existente na interface eletrodo/solução e da corrente faradáica resultante de um processo redox. A medida da corrente é realizada após a diminuição da corrente capacitiva que decai exponencialmente com o tempo após a aplicação do pulso de potencial, aproximando-se de zero, diferentemente da corrente faradáica como mostrado na Figura 7. Assim, medindo-se as correntes apenas neste momento, a corrente capacitiva é reduzida e a razão sinal-ruído torna-se maior. O resultado é uma melhora na sensibilidade.<sup>69,76</sup>



**Figura 7-** Variação da corrente faradáica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso, onde  $\tau$  é o período do pulso.<sup>76</sup>

As técnicas de VPD e VOQ são utilizadas em métodos de redissolução que abrangem uma variedade de procedimentos eletroquímicos que incluem uma etapa de pré-concentração quantitativa seguida por uma etapa voltamétrica, proporcionando maior sensibilidade. Nestes métodos o analito é eletrodepositado (redissolução anódica ou catódica) ou adsorvido (redissolução adsortiva) no eletrodo e posteriormente redissolvido.<sup>69</sup>

### 3.4 Eletrodos quimicamente modificados para a determinação de etinilestradiol

O eletrodo de trabalho é onde a reação de interesse ocorre e sua seleção depende de fatores como o comportamento redox e a concentração do analito-alvo, interferentes presentes na amostra, a corrente de fundo sobre a região de potencial necessária para a medição, janela de potencial, condutividade elétrica, reprodutibilidade da superfície, custo, disponibilidade e toxicidade.<sup>74</sup>

Para garantir essas características, o uso de eletrodos quimicamente modificados é alvo de diversos grupos de pesquisa em todo mundo. De acordo com a União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry), um eletrodo quimicamente modificado é aquele feito de um material condutivo ou semicondutor que é revestido com um filme monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico que exhibe propriedades químicas, eletroquímicas e/ou ópticas.<sup>77</sup>

De forma geral, superfícies modificadas possuem os seguintes aspectos:<sup>78</sup>

- Transferência de propriedades físico-químicas do modificador para o eletrodo;
- Aumento da atividade eletrocatalítica, devido ao uso de materiais com grande área superficial que por sua vez permite uma melhor sensibilidade;
- Seletividade melhorada quando existe afinidade de substâncias de interesse com grupos funcionais imobilizados;
- Cinética rápida de difusão no caso de alguns materiais;
- Extração e acúmulo da substância analisada pelo eletrodo.

Na determinação eletroanalítica de EE2 diversos materiais têm sido utilizados para modificação de eletrodos. Pavinatto et al<sup>20</sup> por exemplo utilizaram um substrato de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) modificado com quitosana (Chi) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), o qual apresentou limite de detecção (LD) de 0,09  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a determinação de EE2 com a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) utilizando tampão fosfato-salino (pH 7,0) como eletrólito de suporte. A precisão do eletrodo FTO-Chi/CNTs foi avaliada em amostra de urina sintética com valores de recuperação entre 98,8 e 106 %. O estudo de interferentes foi realizado com NaCl, KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , glucose, ureia, ácido ascórbico e ácido úrico, apresentando 7% de diminuição do sinal do EE2 quando misturado com todas essas espécies. Para oito medições sucessivas de EE2 com o eletrodo, o desvio padrão relativo foi de 3,2% para um eletrodo e 6,6% quando três eletrodos idênticos foram utilizados.

Amostras de urina de um homem saudável foram analisadas por Prado et al<sup>79</sup>, com eletrodos de carbono vítreo (GCE) modificados com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido (rGO) e nanopartículas de óxido de rutênio ( $\text{RuO}_2$ ). Os valores de recuperação variaram entre 96 e 101,1 %, enquanto ácido ascórbico e ácido úrico não apresentaram interferência no sinal. O LD do método foi de  $2,04 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando a técnica de VPD e tampão fosfato-salino (pH 7,0) como eletrólito de suporte. Enquanto que para dez medições consecutivas de EE2, o coeficiente de variação foi 2,94% e, para 5 eletrodos diferentes fabricados com o mesmo procedimento, foi de 4,57 %.

Um desafio nas medidas de EE2 é diminuir a interferência de outros estrogênios que oxidam em potencial muito próximo e que apresentam moléculas parecidas como, por exemplo, o estradiol. Para solucionar esse problema têm sido inseridos na modificação do eletrodo elementos biológicos específicos para EE2.

Canevari et al<sup>80</sup> realizaram a modificação de GCE com um nanomaterial híbrido baseado em nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT) com pontos quânticos de

carbono (C-dot) e a enzima lacase (Lac). Com a técnica de VPD, o LD foi de  $4,0 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> para o EE2, utilizando tampão fosfato-salino (pH 7,0) como eletrólito de suporte. Após 10 medições sucessivas com 5 eletrodos diferentes fabricados da mesma maneira o sinal de oxidação do EE2 diminuiu menos que 3,2 %. Além disso, o eletrodo apresentou a mesma resposta por mais de 1 mês, quando armazenado em temperatura de 4 °C. O estriol, estradiol, bisfenol, ácido ascórbico, ácido úrico não interferiram na medida do EE2. A análise de urina de uma mulher saudável e de água de torneira com esse eletrodo mostrou valores de recuperação entre 98,4 e 101,1 %.

Outra estratégia realizada por Scala-Benuzzi et al.<sup>14</sup> para diminuir a interferência de outras espécies e, além disso, diminuir o limite de detecção do método consistiu em um ensaio de imunocaptura. Nessa estratégia, zonas impressas com cera em papel no diâmetro de 7 mm foram modificadas com nanopartículas de sílica (SNs) e anticorpos específicos (anti-EE2) com o intuito de capturar e pré-concentrar EE2 nas amostras. Após a captura, o papel foi colocado sobre um eletrodo impresso de carbono modificado com óxido de grafeno reduzido (rGO). Utilizando a técnica de VOQ e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na concentração de  $10 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> como eletrólito de suporte, o LD do método foi de  $3,37 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup>. A precisão foi avaliada com ensaios intra-dia e inter-dia e tiveram desvios padrões relativos menores que 5,2%. O teste de recuperação realizado em amostras de água de rio obteve valores variando de 97,5% a 103,7%.

Apesar das vantagens de maior sensibilidade e seletividade, inserir elementos biológicos no método pode ter algumas desvantagens, como por exemplo, a instabilidade em altas temperaturas, sendo assim inapropriado para realização de medidas em campo. Além disso, apesar da disponibilidade comercial de muitos desses elementos, o seu custo elevado pode ser outra desvantagem.

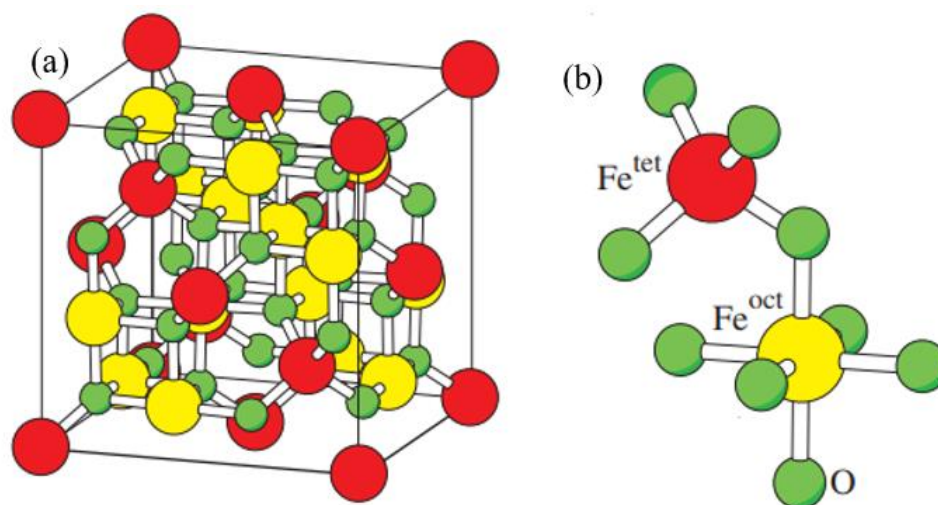
As nanopartículas de óxido de ferro e as metalofalocianinas apresentam características interessantes para modificação de eletrodos, incluindo baixo custo de obtenção, solubilidade em meio aquoso, estabilidade química e atividade eletrocatalítica, além da capacidade de formar filmes ultrafinos. A descrição e exemplos de sensores que contém esses materiais serão apresentados nos próximos tópicos.

### **3.4.1 Nanopartículas de óxido de ferro**

Os íons de ferro são conhecidos por cristalizar em mais de 20 formas de óxidos/(oxi) hidróxidos. Os óxidos de ferro são compostos comuns, que existem como minerais naturais e

também podem ser produzidos artificialmente, principalmente na forma de nanopartículas. Em geral, quando as nanopartículas de óxidos de ferro são empregadas na modificação de eletrodos, propiciam alta sensibilidade devido à relação superfície-volume elevada e atividade electrocatalítica. Além disso, podem ser sintetizadas a baixo-custo.<sup>81,82</sup>

Devido a essas características, nanopartículas de óxido de ferro, destacando-se a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maguemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) são amplamente utilizadas em dispositivos eletroquímicos. A magnetita cristaliza em uma estrutura de espinélio inverso, com rede cúbica de face centrada, como ilustrada na Figura 8a. Sua cela unitária contém 16 íons de  $\text{Fe}^{3+}$ , 8 íons de  $\text{Fe}^{2+}$  e 32 íons de  $\text{O}^{2-}$ . Dos íons  $\text{Fe}^{3+}$ , 8 ocupam sítios tetraédricos, enquanto os 8 restantes, juntamente com todos os íons de  $\text{Fe}^{2+}$ , ocupam sítios octaédricos, conforme ilustrado na Figura 8b.<sup>83</sup> A maguemita é o equivalente oxidado da magnetita, em que quase todos os íons de Fe se apresentam em estado trivalente. Os íons de ferro divalentes na superfície da magnetita tendem a se oxidar transformando-a em maguemita. A oxidação é um processo natural devido a sua alta área superficial exposta ao oxigênio.<sup>83</sup>



**Figura 8-**Representação de (a) célula unitária espinélio de face centrada para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e (b) ampliação de um tetraedro e um octaedro adjacente compartilhando um átomo de oxigênio. As esferas maiores representam os átomos de ferro  $\text{Fe}^{\text{tet}}$   $\text{Fe}^{\text{oct}}$  sob sub-redes tetraédricas e octaédricas, respectivamente. As esferas menores são os átomos de oxigênio.<sup>84</sup>

Além disso, a alta mobilidade eletrônica na estrutura das nanopartículas de magnetita dá origem a uma interessante química de superfície. Diferentes transferências iônicas e/ou eletrônicas interfaciais, dependendo do pH da suspensão podem estar envolvidos também nesta transformação. Em meio alcalino, a oxidação ocorre por redução de oxigênio na superfície das partículas (somente transferência de elétrons) e coordenação de íons de óxido, enquanto em



meio ácido, pH em torno de 2,0, e condições anaeróbicas, íons de  $\text{Fe}^{2+}$  da superfície são desorvidos como hexa-aquo complexos em solução (transferência de elétrons e de íons).<sup>85</sup>

Além da instabilidade e a oxidação, outro problema comum às nanopartículas de magnetita é a tendência a aglomerar, dificultando o controle do tamanho da partícula em escala nanométrica. Essa dificuldade se dá por causa da presença de forças de Van der Waals, interação dipolar (já que são magnéticas) e alta energia de superfície. Estas forças atrativas podem ser minimizada por processos físicos como o cisalhamento, ou químicos, que envolvem adição de surfactantes ou funcionalização da superfície.<sup>86</sup>

Por tanto, para obter nanopartículas de magnetita estáveis, o controle crítico de vários parâmetros de síntese é necessário tais como atmosfera, pH, temperatura e controle da relação  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ . Devido à dificuldade no controle desses parâmetros, a composição final das nanopartículas pode ficar entre magnetita e maguemita.<sup>87</sup> O método de co-precipitação de sais em meio aquoso constitui, muito provavelmente, a via química mais simples e eficaz para obter nanopartículas de óxido de ferro. Este envolve a formação de espécies de baixa solubilidade em situações de supersaturação, sendo que tais condições são atingidas, geralmente, por meio de reação química.<sup>88</sup>

A co-precipitação é dividida basicamente em duas partes; nucleação, em que aglomerados ou núcleos extremamente pequenos (usualmente nanométricos) são formados, e o crescimento, que é lento e uniforme, envolvendo uma combinação de agregação irreversível dos núcleos e difusão de átomos para o núcleo. Para nanopartículas de óxido de ferro monodispersas, essas duas etapas devem ser separadas, isto é, a nucleação deve ser evitada durante o período de crescimento.<sup>89,90</sup>

Outro fator importante para o uso de nanopartículas de óxido de ferro em eletrodos modificados é por terem grupos de oxihidróxido de ferro na superfície que atuam simultaneamente como sítios catalíticos e de adsorção de analito.<sup>91,92</sup> Esses grupos de superfície em pH em torno de 4,0 ficam protonados e formam partículas carregadas positivamente que permanecem estáveis no estado coloidal devido a repulsões eletrostáticas.<sup>93</sup> Essas suspensões podem ser usadas diretamente para deposição de filme e modificação de superfície.<sup>94</sup> Porém, como desvantagem, essas nanopartículas apresentam baixa condutividade eletrônica, o que pode limitar seu uso sozinho. Um segundo componente mais eletroativo, como CNT, rGO, nanopartículas de Au, polímeros condutores e ftalocianinas, é necessário para contornar essa limitação.

Na Tabela 2 são mostrados alguns trabalhos recentes que empregaram nanopartículas de óxido de ferro no desenvolvimento de eletrodos modificados. São apresentadas também as técnicas eletroanalíticas aplicadas e os limites de detecção (LD) obtidos nas metodologias para a determinação eletroanalítica de diferentes espécies.

**Tabela 2-** Eletrodos modificados com nanopartículas de óxido de ferro

Descrição do eletrodo modificado	Analito	Técnica	LD (nmol L <sup>-1</sup> )
ITO modificado com nanotubos de carbono (SWCNT) e nanopartículas de óxido de ferro. <sup>25</sup>	Ácido salicílico	VPD	70
GCE modificado com nanocompósito de rGO e magnetita. <sup>95</sup>	Ácido úrico	Amperometria	0,12
ITO modificado com nanocompósito de maguemita, polianilina e quitosana. <sup>96</sup>	Paracetamol	Potenciometria	5700
GCE modificado com nanocompósito de rGO e nanopartículas de magnetita e de ouro. <sup>97</sup>	Catequil (CQ) e Hidroquinona (HQ)	VPD	CQ- 20 HQ- 170
GCE modificado com nanotubos de carbono (MWCNT), nanopartículas de ouro e nanopartículas de magnetita funcionalizadas com ácido tânico. <sup>14</sup>	EE2	VPD	3,3

### 3.4.2 Ftalocianinas

As ftalocianinas (Pc) são compostos formados por moléculas macrocíclicas conjugadas contendo um anel interno de 16 membros formado por quatro unidades isoindol ligadas por quatro átomos de nitrogênio, ilustradas na Figura 9. Os anéis aromáticos do macrociclo conferem ao composto uma alta densidade eletrônica devido a um sistema conjugado de 18 elétrons  $\pi$ .<sup>98</sup>



**Figura 9-** Estrutura de uma metaloftalocianina, M representa o metal.<sup>99</sup>

A Pc é o ânion ftalocianinato  $C_{32}H_{16}N_8^{2-}$  e  $H_2Pc$  representa a sua forma livre de metal. Os dois átomos de hidrogênio central podem ser substituídos por quase todos os metais na tabela periódica, que geralmente têm o estado de oxidação 2+. Neste caso, os derivados metálicos das ftalocianinas, as metaloftalocianinas (MPc) são formados (Figura 9).<sup>98</sup>

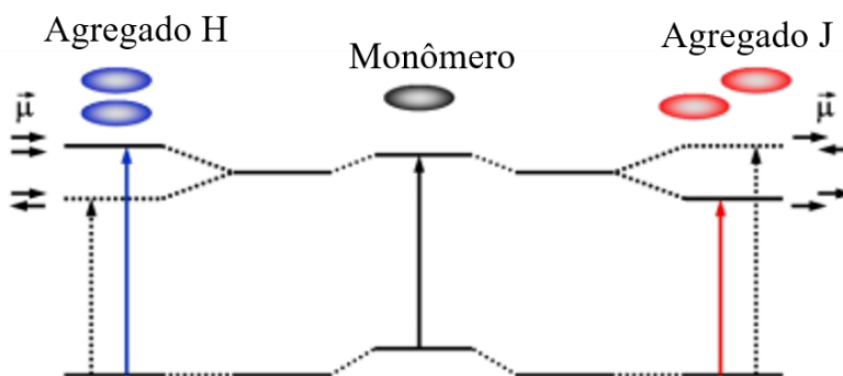
As MPc são de grande interesse devido a sua diversificada química de redução e oxidação, associada ao sistema de 18 elétrons  $\pi$  do macrociclo e da presença do átomo de metal central. Além disso, a possibilidade de variação dos substituintes na cadeia lateral, sua estabilidade térmica (até cerca de  $500^\circ C$ ) e química (especialmente sob condições altamente oxidativas, como em ácido sulfúrico concentrado), seu baixo-custo e facilidade de sintetizar em larga escala, podem permitir a produção de filmes finos e otimizados com diferentes graus de sensibilidade e seletividade, sendo propriedades importantes que as tornam moléculas a serem incorporadas em sensores eletroquímicos.<sup>100,101</sup>

A  $H_2Pc$  e as MPc são insolúveis em alguns solventes orgânicos e em água devido à agregação das moléculas decorrentes das interações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  (do inglês,  $\pi$ - $\pi$  stacking). A solubilidade pode ser melhorada com a inserção de grupos substituintes no anéis benzênicos periféricos da molécula. Para a solubilização em água, são introduzidos grupos ionizáveis, tais como ácido carboxílico, amina ou ácido sulfônico. MPc tetrasulfonadas são bastante solúveis em água e estão disponíveis comercialmente, com custo relativamente baixo

(R\$ 100,00/g). A substituição com grupos funcionais também aumenta a atividade catalítica da ftalocianina metálica. Por exemplo, os grupos sulfônicos ( $-\text{SO}_3^-$ ) na NiTsPc diminuem a densidade eletrônica do centro metálico, o que facilita a oxidação do Ni em comparação com a NiPc sem substituintes.<sup>102,103</sup>

A inserção dos grupos substituintes nas MPc permite a sua solubilização, porém inevitavelmente ocorre a formação de agregados que podem ser do tipo H em que as moléculas são dispostas face-a-face e do tipo J, o qual possui arranjo molecular lado-a-lado. A Figura 10 apresenta um diagrama de energia qualitativo mostrando que o monômero tem um único estado excitado, enquanto que os agregados têm dois estados de energia excitados possíveis: aquele em que os momentos de transição das duas moléculas são paralelos e outro onde eles são antiparalelos.

No agregado tipo H o estado de energia superior é aquele onde os momentos de transição são paralelos, tornando-o fortemente permitido e absorção é deslocada para o azul em comparação a absorção do monômero, o inverso é o caso para o agregado tipo J, fazendo a transição de energia inferior o mais fortemente permitido e a absorção é deslocada para o vermelho.<sup>104,105</sup> Assim, com a técnica de espectroscopia de absorção do UV-Vis é possível caracterizar a interação dessas moléculas em um filme por exemplo.



**Figura 10-** Diagrama de energia simplificado para agregados tipo H e tipo J. A seta contínua representam a transição de maior probabilidade e as setas pontilhadas a de menor probabilidade,  $\vec{\mu}$  representa o dipolo induzido da molécula.<sup>105</sup>

Portanto, diante das características apresentadas, MPc têm sido empregadas na modificação de eletrodos para a determinação eletroanalítica de diversas espécies, como mostrado nos trabalhos apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3-** Eletrodos modificados com metaloftalocianinas.

Descrição do eletrodo modificado	Analito	Técnica	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
Eletrodo de ouro modificado com NiTsPc e nanopartículas de ouro. <sup>106</sup>	Tartrazina	VPD	0,055
GCE modificado com rGO e ftalocianina de manganês. <sup>107</sup>	Imidacloprida	VC	6,5
GCE modificado com nanopartículas de prata e mono(amino) ftalocianina de cobre funcionalizada com polímero acrilato. <sup>108</sup>	Ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (AU)	VC	AA= 0,005 DA=0,007 AU= 0,0025
GCE modificado com nanocompósito de ftalocianina de cobalto e nanotubos de carbono. <sup>109</sup>	Nitrito	VPD	2,11
GCE modificado com nanotubos de carbono (MWCNT) e ftalocianina de cobalto. <sup>110</sup>	EE2	VOQ	2,20

### 3.4.3 Eletrodos modificados com nanopartículas de óxido de ferro e ftalocianinas

Existem poucos trabalhos descritos na literatura que empregam a combinação de ION e Pc na modificação de eletrodos. Mphuthi et al<sup>101</sup> modificaram eletrodos GCE com compósito de H<sub>2</sub>Pc, magnetita e MWCNT para a detecção de epinefrina e norepinefrina, alcançando LD de 4,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 2,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Em outra abordagem utilizando o mesmo eletrodo foi realizada a detecção de dopamina com LD= 1,35  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .<sup>82</sup>

Cheng et al. desenvolveram nanocompósitos de ION incorporadas à Pc-Fe suportadas em grafeno como eletrocatalisadores para a reação de redução de oxigênio. Os resultados de voltametria cíclica indicaram que as nanopartículas de óxido de ferro interagem com o centro ativo da Pc-Fe, melhorando a transferência eletrônica e a reversibilidade do par redox Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup>, promovendo assim a melhoria da atividade para a reação de redução do oxigênio.<sup>111</sup>

Considerando o potencial desses dois materiais, a tese de doutorado descreve o seu uso na modificação de eletrodos de vidro condutor tipo ITO, avaliação do desempenho como

eletrodos de trabalho para oxidação de EE2 e aplicação do método voltamétrico para determinação de EE2 em água e em urina sintética. Com o objetivo de avaliar a confiabilidade do método desenvolvido parâmetros de validação descritos no seguinte tópico foram determinados.

### 3.5 Validação de métodos analíticos

Para demonstrar que um método analítico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida, no geral é necessário realizar experimentos padrões com o objetivo de obter parâmetros de desempenho do método como: seletividade, faixa linear de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e precisão.<sup>112</sup>

A seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito de interesse na presença de outras substâncias, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.<sup>113</sup> A faixa linear de trabalho de um procedimento analítico consiste no intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstra ter um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade.<sup>114</sup>

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método, que representa o limite de detecção (LD), enquanto que limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis.<sup>112,114</sup>

A exatidão de um método pode ser avaliada numericamente por meio da recuperação que é definida como a razão entre o valor médio observado para a medida do analito e o valor esperado, esses valores são obtidos pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. A faixa da recuperação média aceitável se expande conforme a concentração do analito diminui.<sup>112,113</sup>

A validação de metodologia também inclui a investigação da precisão, que pode ser expressa pela repetibilidade que é medições repetidas com o mesmo procedimento, operadores, local e durante um curto período de tempo, precisão intermediária que deve variar uma ou mais condições nas medidas como o analista, o equipamento ou o tempo e reprodutibilidade para medidas realizadas em diferentes laboratórios.<sup>112</sup>

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos experimentos e suas respectivas marcas e pureza são apresentados na Tabela 4, todos foram usados sem qualquer procedimento adicional de purificação.

**Tabela 4-** Regentes utilizados.

Reagentes	Marca	Pureza mínima
Acetato de sódio	Sigma-Aldrich	99 %
Etinilestradiol (padrão certificado)	Sigma-Aldrich	98 %
Estriol (padrão certificado)	Sigma-Aldrich	97 %
Estrona, Bisfenol A e Triclosan (padrões certificados)	Sigma-Aldrich	99 %
Cloreto de sódio	Vetec	99,5 %
Nitrato de potássio	Merck	99 %
Sulfato de sódio	Dinâmica	99 %
Ácido acético	Merck	99,8 %
Ácido clorídrico	Vetec	37%
Ácido bórico	Vetec	99,5 %
Ácido perclórico	J.T. Baker	71,3 %
Ácido fosfórico	Merck	85 %
Ftalocianina tetrasulfonada de níquel (II)	Sigma-Aldrich	85 %
Sulfato de ferro (II) heptahidratado	Sigma-Aldrich	99 %
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	Sigma-Aldrich	97 %
Cloreto de potássio	Vetec	99 - 100,5 %
Hidróxido de potássio	Vetec	85 %
Hidrocloreto de poli(dialildimetil amônio) (PDAC)	Sigma-Aldrich	20 % em água
Hidróxido de sódio	Vetec	98 %
Poliestireno sulfonado (PSS)	Sigma-Aldrich	99 %
Di-hidrogenofosfato de potássio	Vetec	99 %
Cloreto de amônio	Vetec	99,5 %

Os preparos das soluções utilizadas são descritos a seguir:

- Solução 5% v/v de detergente alcalino Dertec - 25 mL de detergente em 500 mL de água ultrapura.
- Solução 5% v/v de KOH em álcool - 5 ml de solução aquosa saturada de KOH em 100 ml de álcool 95%, agitado e filtrado em funil de vidro sinterizado após 24 horas de decantação.
- Sulfato de ferro(II) heptahidratado  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  - 0,28 g de sulfato de ferro (II) heptahidratado em 10 mL de água ultrapura.
- Cloreto de ferro(III) hexahidratado  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  - 0,56 g de cloreto de ferro (III) hexahidratado em 10 mL de água ultrapura.
- Ácido clorídrico  $2 \text{ mol L}^{-1}$  - 1,7 mL de HCl em 10 mL de água ultrapura.
- Hidróxido de sódio  $0,9 \text{ mol L}^{-1}$  - 3,71 g de hidróxido de sódio em 100 mL de água ultrapura.
- PDAC  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 0,25 g de PDAC em 50 mL de água ultrapura.
- PSS  $1 \text{ g L}^{-1}$  - 0,05 g de PSS em 50 mL de água ultrapura.
- Tampão RB (pH 2,0 a 6,0) - preparado com a mistura das soluções de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e solução de NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  para ajustar o pH.
- Tampão acetato de sódio (pH 4,0 e 4,5) - solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de acetato de sódio e solução  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido acético para ajustar o pH.
- Padrão de EE2  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  - 0,378 g em 25mL de água ultrapura.
- Cloreto de potássio pH 4,0 –solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de cloreto de potássio e solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico para ajustar o pH.
- Sulfato de sódio pH 4,0 –solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de sulfato de sódio e solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido sulfúrico para ajustar o pH.
- Nitrato de potássio - solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de nitrato de potássio e solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido nítrico para ajustar o pH.

## 4.2 Limpeza das vidrarias

As vidrarias utilizadas neste trabalho foram lavadas inicialmente com detergente neutro para retirar o excesso de resíduos, enxaguadas em água corrente e deixadas por 2 horas completamente imersas, em solução 5% v/v de detergente alcalino Dertec em água ultrapura



(resistividade: 18 Mohm.cm). Após este tempo, as vidrarias foram enxaguadas com água corrente e, posteriormente, com solução 5% v/v de KOH em álcool, para remoção de compostos orgânicos presentes.

As vidrarias foram por fim lavadas abundantemente com água corrente e em seguida com água ultrapura. Após a limpeza realizada, as vidrarias foram secas a temperatura ambiente e armazenadas em recipiente limpo e fechado evitando contaminação do ar.

### 4.3 Preparação dos eletrodos modificados

#### 4.3.1 Limpeza do substrato de vidro condutor

Os eletrodos de trabalho foram preparados sobre substratos de vidro (1 mm x 10 mm x 20 mm) recobertos com um filme condutor de óxido de estanho dopado com índio ( $\text{SnO}_2 \cdot x\text{In}$ ; resistividade: 15 ohm.cm), também conhecido como ITO (do inglês, *indium tin oxide*). Antes da deposição das nanoestruturas, foi realizada a limpeza desse substrato esfregando manualmente ambos os lados com detergente neutro e depois os mantendo num béquer com água destilada por 20 minutos em banho ultrassom.

Após esse período, os substratos foram enxaguados com água ultrapura por 5 vezes para a remoção do detergente e colocados num béquer, apenas com água ultrapura, e banho ultrassom por 20 minutos. Ao término das etapas, os substratos foram armazenados imersos em água ultrapura e em geladeira até a deposição dos nanomateriais.

#### 4.3.2 Preparo das nanopartículas de óxido de ferro e da ftalocianina

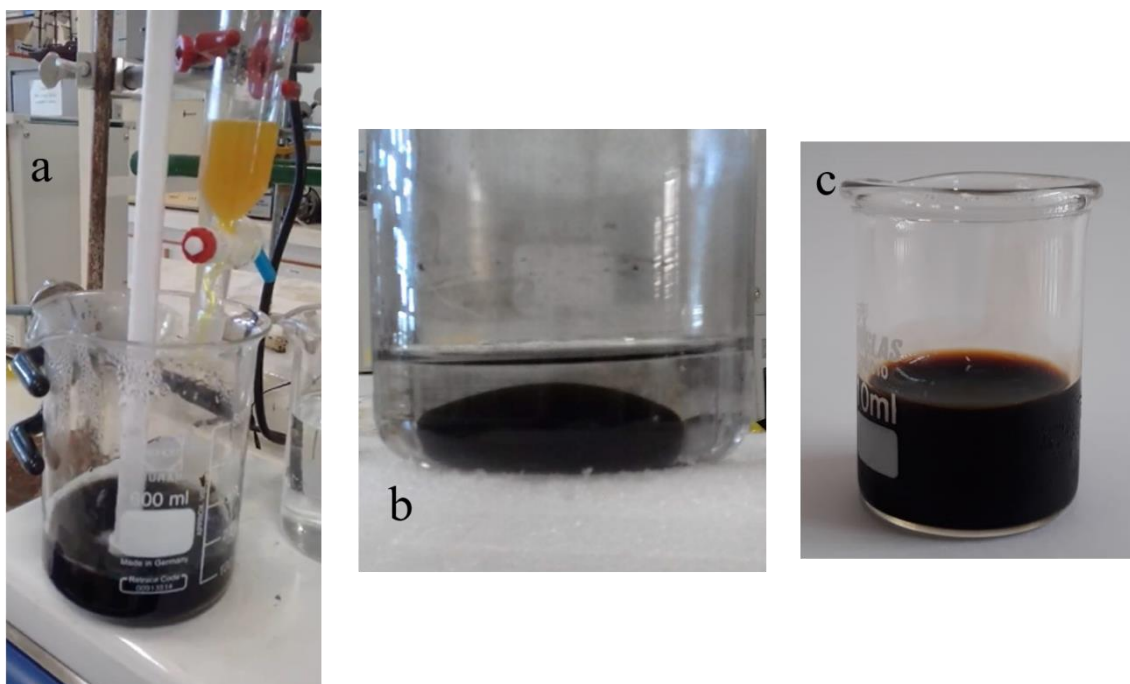
O preparo das nanopartículas de óxido de ferro foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LABPOLN) do Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ-UnB). Nanopartículas de magnetita (np-Mgn), maguemita (np-Mgm) e mistura das duas fases (ION) foram preparadas por co-precipitação.

As nanopartículas de magnetita foram preparadas conforme descrito por Jolivet e Tronc<sup>115,116</sup>, inicialmente foi purgado nitrogênio por 20 minutos na água ultrapura utilizada para o preparo das soluções para assim evitar oxidação do Fe(II) pelo oxigênio dissolvido na água. Então a np-Mgn foi sintetizada a partir da mistura de 2,5 mL de sulfato de ferro (II) heptahidratado na concentração de 2 mol L<sup>-1</sup> (preparado em HCl 2 mol L<sup>-1</sup>) com 10 mL de

cloreto de ferro (III) hexahidratado na concentração de  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , essa mistura foi adicionada gota a gota em 100 mL de solução de NaOH ( $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ ) a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação com um auxílio de uma haste de agitação como mostrado na Figura 11a. Após finalizar o gotejamento manteve-se a agitação por 10 minutos, depois em repouso as nanopartículas decantaram com o auxílio de um ímã (Figura 11b) e em seguida foram lavadas por 3 vezes com água ultrapura. A estequiometria da reação para a síntese por co-precipitação é como se segue:



As np-Mgn foram então dispersas em 25 mL de água e o pH foi ajustado para 4,0 com HCl  $2 \text{ mol L}^{-1}$  em seguida a suspensão foi submetida a agitação ultrassônica pulsada (Branson 450; potência: 250 W; tempo: 10 minutos; pulso: 5s ligado, 5s desligado) e, depois centrifugada (4500 rpm por 10 minutos), para remover partículas e agregados insolúveis, resultando na dispersão apresentada na Figura 11c que foi usada para o preparo dos filmes.



**Figura 11-** (a) Gotejamento dos sais de Fe(II) e Fe(III) na solução de NaOH ( $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ ). Nanopartículas de magnetita (b) decantadas e (c) dispersas em HCl, pH 4,0.

O procedimento de síntese das nanopartículas de maguemita é amplamente descrito na literatura<sup>117,118</sup> e consiste na mistura de 40 mL de  $\text{FeCl}_3$  na concentração de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e 10 mL de  $\text{FeCl}_2$  na concentração de  $2 \text{ mol L}^{-1}$  preparado em HCl ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ), essa mistura foi

adicionada em 500 mL de solução de amônia ( $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ ), em temperatura ambiente para precipitação de magnetita. Após 30 minutos de vigorosa agitação, separou-se o precipitado decantado com o auxílio de um ímã, em seguida lavou-se com água e 100 mL de  $\text{HNO}_3$  ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi adicionado para acidificar o meio e criar cargas positivas na superfície. As nanopartículas foram novamente decantadas e no precipitado ácido foi adicionado 140 mL do agente oxidante  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  na concentração de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  para a oxidação das nanopartículas de magnetita para maguemita, o aquecimento foi mantido por 15 minutos. Após essa etapa as np-Mgm foram lavadas com acetona e éter etílico e, finalmente dispersas em solução aquosa de  $\text{HNO}_3$  com pH aproximadamente 1,5.

As ION foram preparadas, segundo método descrito na literatura com adaptações.<sup>119,120</sup> Uma solução aquosa (20 mL) contendo sulfato de ferro (II) heptahidratado na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e cloreto de ferro (III) hexahidratado na concentração de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  foi adicionada gota a gota sobre 25 mL de solução de  $\text{NaOH}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) sob agitação magnética e a temperatura ambiente. Depois da completa adição da solução de íons de ferro, a mistura foi mantida em agitação por mais 30 minutos, também em temperatura ambiente. O precipitado preto foi isolado por decantação com o auxílio de um ímã e lavado (3 vezes) com água ultrapura.

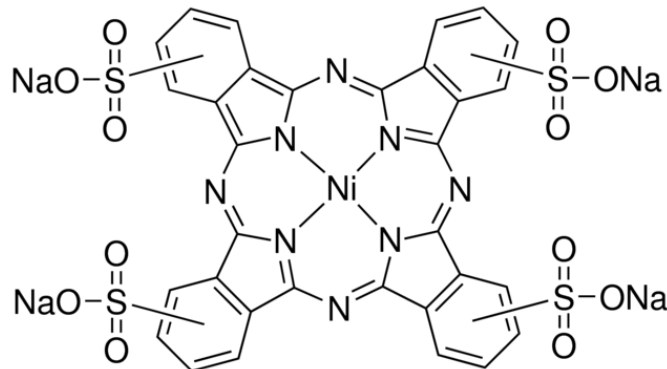
As partículas isoladas foram dispersas em solução aquosa de  $\text{HClO}_4$  (pH 4) com agitação magnética durante 18 horas. Após o passo de agitação, a dispersão coloidal obtida foi submetida a agitação ultrassônica pulsada (Branson 450; potência: 250 W; tempo: 10 minutos; pulso: 5s ligado, 5s desligado) e, em seguida, centrifugada (4500 rpm por 10 minutos), para remover partículas e agregados insolúveis.

Um detalhe importante é que no preparo das ION não se realizou um controle rigoroso que evitasse a oxidação das nanopartículas como o realizado na síntese das np-Mgn, portanto houve conversão parcial da fase magnetita à maguemita, de modo que essas nanopartículas são mais bem descritas como sendo constituídas de uma mistura de óxidos de ferro e por isso estão sendo abreviadas como ION.

Todas as nanopartículas preparadas possuem alta energia superficial o que as torna instáveis e susceptíveis a agregação, o meio ácido então protona a superfície das nanopartículas e, portanto, garante a estabilidade coloidal por meio de forças de repulsão eletrostática, resultando em dispersões que foram empregadas como fonte de nanopartículas para deposição dos filmes.

A solução de ftalocianina de níquel(II) tetrassulfonada ( $\text{NiTsPc}$ ), estrutura apresentada

na Figura 12, foi preparada na concentração de  $1 \text{ g L}^{-1}$  em água ultrapura com auxílio de agitação magnética.



**Figura 12-** Fórmula estrutural da NiTsPc.<sup>32</sup>

#### 4.3.3 Deposição dos filmes sobre vidro condutor via LbL

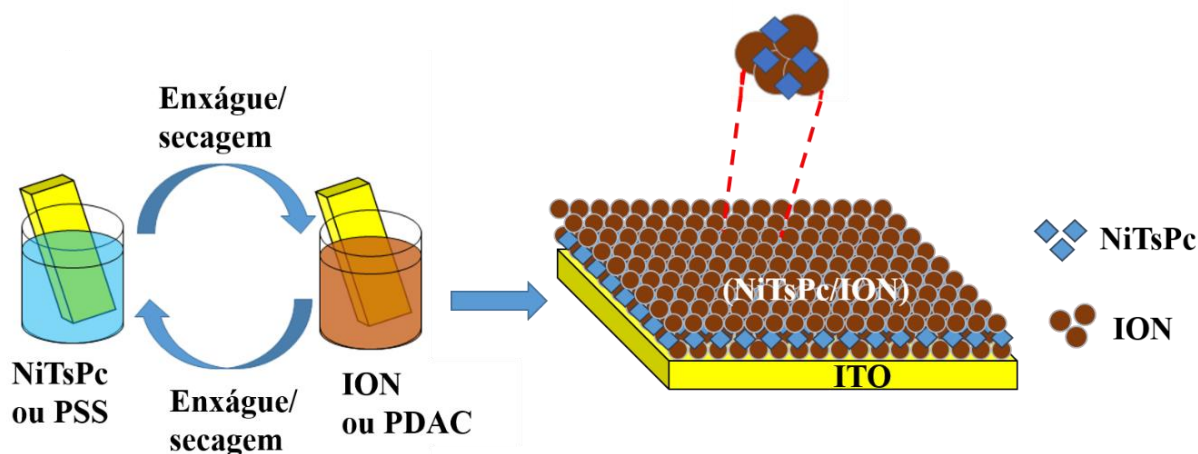
Os substratos de ITO foram modificados com filmes ultrafinos de NiTsPc/ION via técnica de automontagem camada por camada (LbL do inglês, *layer-by-layer*). Esta técnica de preparo de eletrodos modificados é simples, não exige vidrarias ou equipamentos sofisticados, e a deposição pode ser realizada em diversos substratos, tais como plástico, vidro e metais, e em qualquer formato, tais como lâminas planas, esferas e hastes.<sup>121</sup> A forma mais comum de realizar a deposição dos (nano)materiais via LbL é a utilização de interações eletrostáticas entre materiais iônicos de cargas opostas.

A formação de filmes com camadas adsorvidas sequencialmente é realizada por imersão sucessiva de um substrato alternadamente nos reservatórios com soluções/suspensões de materiais catiônicos e aniônicos. Entre cada imersão, o conjunto substrato-camada é enxaguado e secado para remover o excesso de material.<sup>121</sup>

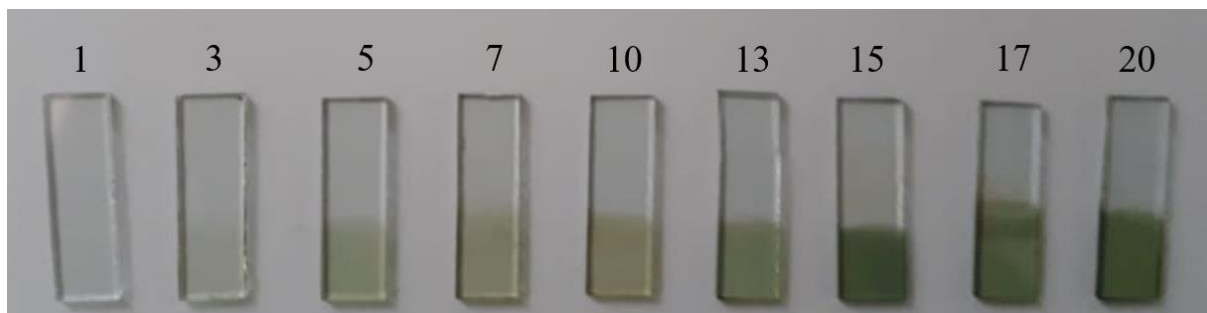
Portanto, neste trabalho o preparo dos eletrodos realizado no LABPOLN foi baseado na atração eletrostática entre os grupos sulfônicos presentes nos anéis de NiTsPc que exibem comportamento aniônico e as nanopartículas de óxido de ferro em meio ácido, que são catiônicas. Além disso, o filme também é formado por ponte Fe(III)-O-Ni(II), como será apresentado no tópico 5.3.4 e Figura 25. Para garantir um número suficiente de sítios de adsorção para os nanomateriais, o substrato de ITO foi primeiramente funcionalizado com uma bicamada do polieletrólito catiônico hidrocloreto de poli(dialildimetil amônio) (PDAC, MM  $450.000 \text{ g mol}^{-1}$ ) e polieletrólito aniônico de poli(estireno sulfonato de sódio) (PSS, MM  $70.000 \text{ g mol}^{-1}$ ).

Uma representação ilustrativa do processo de modificação dos eletrodos pela técnica LbL é apresentada na Figura 13. Inicialmente, o substrato de ITO foi imerso na solução de PDAC ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e posteriormente em PSS ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) após essa pré-camada a imersão foi realizada alternadamente na suspensão de ION e na solução de NiTsPc. O tempo de imersão em cada solução/suspensão foi de 3 minutos enquanto o tempo de enxágue foi de 20 segundos. Água ultrapura foi usada no enxágue após a deposição de PDAC, PSS e NiTsPc, enquanto uma solução pH 4 de  $\text{HClO}_4$  foi empregada no enxágue após a camada de ION. Ainda, após cada camada depositada e enxágue, o substrato modificado foi seco com jato de ar comprimido.

A arquitetura dos eletrodos modificados foi composta por uma bicamada de PDAC/PSS e bicamadas de ION e NiTsPc,  $(\text{NiTsPc}/\text{ION})\text{-n}$ , com número de bicamadas  $(n) = 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17$  e  $20$ , na Figura 14 são apresentadas fotografias digitais desses eletrodos. Para comparação, eletrodos de ITO modificados com diferentes nanomaterias fornecidos pelo LABPOLN, que são óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reduzido (rGO), nanopartículas de óxido de Cério (np-Ce) e ouro com citrato ou polímero ramificado poli(etileno imina) (np-Au-Cit ou np-Au-PEI) também foram utilizadas na preparação de eletrodos com as combinações np-Au-PEI/NiTsPc, PDAC/np-Au-Cit, PDAC/rGO, rGO/ION, np-Ce/NiTsPc, np-Ce/GO, np-Au-PEI/np-Au-Cit, GO/ION, PSS/np-Ce e PDAC/GO, além disso NiTsPc/np-Mgm e NiTsPc/np-Mgm foram avaliados. O preparado de todos esses eletrodos foi realizado com 10 bicamadas empregando o mesmo procedimento utilizado para o eletrodo de NiTsPc/ION.



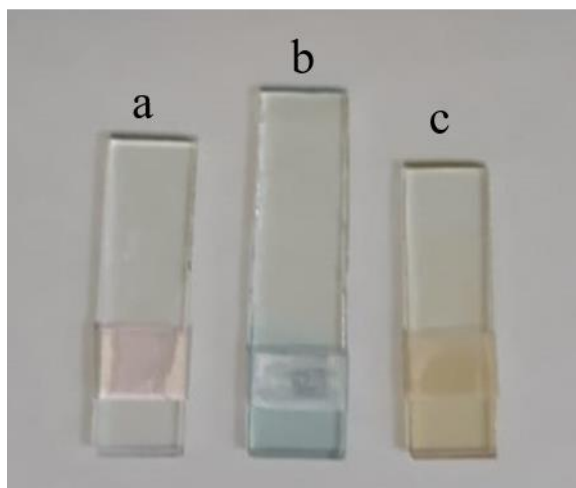
**Figura 13-** Representação ilustrativa do preparo dos eletrodos ITO(ION/NiTsPc) pela técnica LbL.



**Figura 14**-Eletrodos de ITO(NiTsPc/ION)-n com n = 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17 e 20.

Para avaliar a eficiência individual de cada nanomaterial na oxidação de EE2 foram fabricados eletrodos com ION e NiTsPc em separado. Nesse caso, foram fabricados eletrodos com ITO/PDAC(PSS/ION)-10 e ITO/(PDAC/NiTsPc)-10, cujas fotografias digitais são apresentadas na Figura 15.

A área de modificação dos substratos de ITO foi delimitada com fita adesiva do tipo Scotch. Assim, os resultados são expressos em densidade de corrente (J), que é a razão entre a corrente e a área geométrica do eletrodo medida com um paquímetro digital. Esse cuidado foi tomado, pois a corrente depende da área do eletrodo.



**Figura 15**- (a) Substrato de ITO, eletrodos (b) ITO/(PDAC/NiTsPc)-10 e (c) ITO/PDAC(PSS/ION)-10

Eletrodos impressos de carbono (SPCE) também foram modificados com o mesmo procedimento de LbL, com a diferença de que não foi realizada a imersão mas o gotejamento da solução de NiTsPc e da suspensão de np-Mgn no eletrodo de trabalho, para evitar que os demais eletrodos também fossem modificados.

#### 4.4 Caracterização estrutural das nanopartículas de óxido de ferro e dos filmes

A estrutura cristalina da amostra sólida de ION foi avaliada por difração de raios-X realizada na Central Analítica do IQ-UnB com um difratômetro Bruker D8 Focus,  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$  (Cu  $K\alpha$ ),  $0,1^\circ \text{ min}^{-1}$ , resolução  $0,5^\circ$ . Avaliou-se também a morfologia das ION a partir de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) obtidas com o microscópio Jeol Jim 1011, 80 kV do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biologia da UnB (LMM-IB-UnB), a distribuição em tamanho das ION foi verificada com a contagem de no mínimo 300 nanopartículas nas imagens de MET utilizando o software Image J Pro Plus 5. Obteve-se também o potencial zeta e o diâmetro hidrodinâmico das ION utilizando o equipamento Malvern Zeta sizer NanoZS90 localizado no Laboratório de Nanobiotecnologia do IB-UnB, para isso a dispersão foi diluída em solução aquosa de  $\text{HClO}_4$  (pH 4) na proporção de 1:100.

A morfologia do filme de (NiTsPc/ION)-10 depositado sobre ITO foi avaliada com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no equipamento Jeol JSM-7000F, 15 kV, que também foi utilizado para as medidas de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX). As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de platina depositada por *sputtering*. Estes experimentos foram realizados no LMM-IB-UnB. Além disso, foram obtidas também imagens de Microscopia de Força Atômica (“*Atomic Force Microscopy*”, AFM) dos eletrodos ITO(NiTsPc/ION)-n com  $n = 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17$  e 20, utilizando um microscópio Bruker Dimension ICON (pontas de silicone, cantilever com constante de mola de  $40 \text{ N m}^{-1}$ ) do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

Os espectros de UV-Vis dos eletrodos contendo 1, 3, 5, 7 e 10 bicamadas de ION/NiTsPc depositadas em lâmina de quartzo, da solução de NiTsPc e da suspensão de ION foram obtidos com um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 5000 (200 nm a 800 nm, resolução  $0,1 \text{ nm}$ ,  $0,1 \text{ nm s}^{-1}$ ), alocado na Central Analítica do IQ-UnB. Diferentes pontos do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 foram avaliados com um espectrômetro ARC SpectraPro 300i com grades de difração nas bandas UV-Vis-NIR e resolução de  $0,1 \text{ nm}$ , localizado na Universidade Federal do Pará. Para este eletrodo e para a solução de NiTsPc foi realizado também espectroscopia Raman no equipamento InVia da Renishaw, equipado com um microscópio Leica e uma lente objetiva de 50x que foi usada para focar o feixe de laser na amostra e coletar a radiação espalhada (configuração de retroespalhamento). O laser de excitação foi o de HeNe (Renishaw) com emissão em  $632,8 \text{ nm}$  e potência de  $2 \text{ mW}$ . Uma grade

de 1200 linhas/mm foi usada para registrar os espectros. O detector foi um dispositivo de carga acoplada com resfriamento termoelétrico. Todos os espectros foram adquiridos no modo confocal para minimizar a contaminação espectral e os números de onda foram calibrados utilizando uma pastilha de Si. Este experimento foi realizado no Laboratório de Matérias e Combustíveis do IQ-UnB.

#### 4.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria cíclica e de pulso diferencial

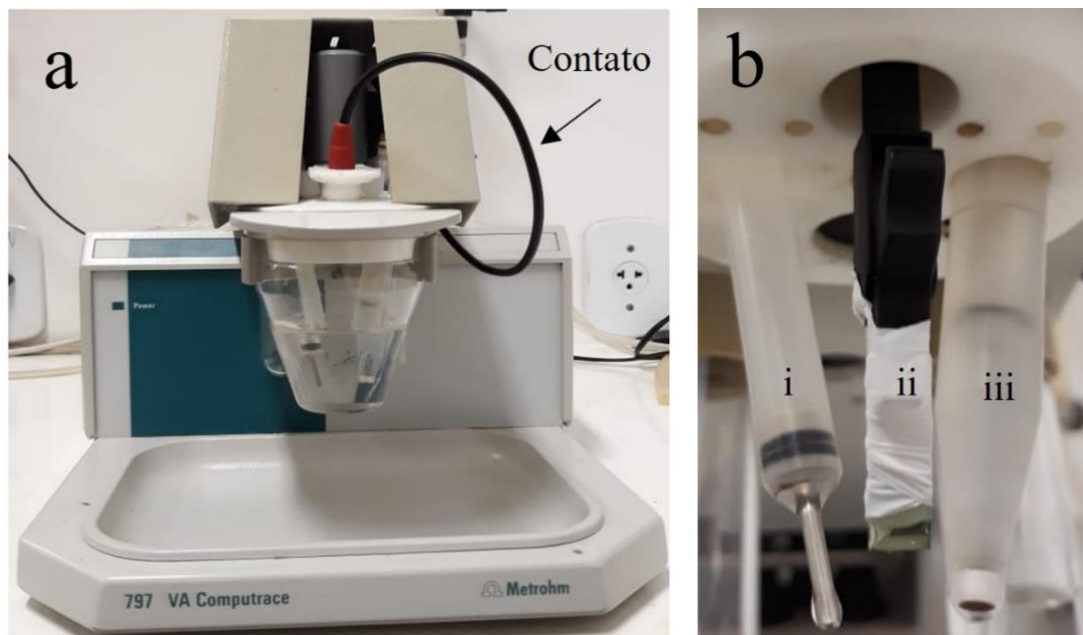
Os experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica (“*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”, EIS) e voltametria cíclica (VC) foram realizados no potenciostato/galvanostato da Metrohm, modelo Autolab/PGSTAT 204 localizado no LABPOLN, enquanto voltametria de pulso diferencial (VPD) foi realizada em potenciostato/galvanostato Metrohm, modelo 797 VA Computrace (Figura 16a) alocado no Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LQAA) do IQ-UnB. A cela eletroquímica utilizada continha um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl saturado), eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de trabalho proposto envolto com teflon como apresentado na Figura 16b, para evitar que o contato ficasse úmido e ocasionasse ruídos. Uma adaptação foi realizada através de um contato elétrico (Figura 16a) para possibilitar a utilização do eletrodo de trabalho fabricado, já que esse equipamento só apresenta contatos para o uso dos eletrodos da Metrohm.

Os experimentos de EIS foram realizados para caracterização eletroquímica dos eletrodos de ITO, e o ITO modificado com (PDAC/NiTsPc)-10, PDAC(PSS/ION)-10 e (ION/NiTsPc)-n, com n= 1, 3, 5, 7 e 10. O eletrólito de suporte foi tampão acetato de sódio pH 4,5 e EE2 na concentração de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi utilizado. Os espectros foram obtidos na faixa de 100 MHz a 0.1 Hz, com amplitude de 50 mV e potencial de cela de +0.75 V. Os resultados foram ajustados com um circuito equivalente utilizando o software Nova 1.11.

A VC foi realizada em tampão acetato de sódio pH 4,5, com o substrato de ITO sem modificação, e o ITO modificado com (PDAC/NiTsPc)-10, PDAC(PSS/ION)-10 e (ION/NiTsPc)-10 para verificar os processos redox da NiTsPc, das ION e a interação entre ambos. Além disso, a VC foi realizada também em tampão acetato de sódio pH 4,5 com o EE2 na concentração de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para analisar o comportamento desse analito na superfície do eletrodo. Para esse estudo, os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de -0,2 a 1,1 V e velocidade de varredura de 10  $\text{mV s}^{-1}$ . Para a determinação do número de elétrons



envolvidos nas reações, os voltamogramas foram registrados em velocidades de 10, 25, 50, 75 e 100  $\text{mV s}^{-1}$  com as mesmas condições citadas acima.



**Figura 16-** Sistema eletroquímico (a) Potenciostato/Galvanostato, (b) Eletrodos i- contra-eletrodo de platina, ii- eletrodo de (NiTsPc/ION)-10 e iii-Eletrodo de referência de Ag/AgCl.

Para a VPD, foi preparada uma solução padrão de EE2 em água ultrapura na concentração de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e realizado adições com micropipeta diretamente sobre o eletrólito de suporte conforme a concentração requerida. Foi realizado um estudo em relação a última camada do eletrodo obtendo-se melhor resposta quando o eletrodo teve ION na camada terminal (tópico 5.4), portanto os experimentos de VPD foram realizados com eletrodos ITO(NiTsPc/ION)-10. Antes da primeira medida com o analito, foram realizadas 6 medidas somente no eletrólito de suporte para estabilização do eletrodo de trabalho. Cada experimento foi realizado com 1 replicata, devido a limitação do uso do eletrodo para muitas medidas.

Devido a adsorção de produtos da oxidação do EE2 na superfície do eletrodo, foi necessário realizar o condicionamento do eletrodo entre as medidas no próprio eletrólito de suporte por 60 s em potencial de -0,6 V, essas condições foram previamente otimizadas como mostrado no tópico 5.6.3. Os eletrólitos de suporte testados foram: tampão RB (pH 2,0 a 6,0) e no pH 4,0, tampão acetato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio e nitrato de potássio, todos em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os parâmetros de VPD, foram testados para se obter melhor resolução e altura de pico, como a velocidade de varredura (5, 10, 20, 30, 40 e  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) e amplitude de pulso (5, 10, 25, 50, 100 e 150 mV).

#### 4.6 Parâmetros de validação de metodologia

Para assegurar a confiabilidade do método desenvolvido, foram realizados experimentos padrões de validação de metodologia, descritos no documento de orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO.<sup>112</sup> Os parâmetros avaliados foram: seletividade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e recuperação, descritos nos resultados e discussão, tópico 5.7.

#### 4.7 Análise de amostras de água e urina sintética

A aplicação do eletrodo ITO/(NiTsPc/ION)-10 foi realizada em amostra de água coletada em frasco de vidro âmbar na estação de tratamento de água da Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CAESB), localizada no Lago Paranoá e mantida em refrigeração até a análise. Essa amostra foi cedida pelo Laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental (AQQUA-UnB). Além disso, amostra de água de torneira coletada no LQAA também foi analisada. Para as medidas eletroquímicas, a amostra de água foi utilizada como solvente para o eletrólito de suporte, portanto, em 15 mL da água coletada foram dissolvidos 0,206 g de acetato de sódio e o pH foi ajustado para 4,0 com ácido acético, posteriormente foi transferido para um balão de 25 mL e aferido com a própria água coletada. Então foram analisadas com os eletrodos de ITO(NiTsPc/ION)-10, 3 alíquotas da amostra utilizando a técnica de VPD e o método de adição de padrão, em que quantidades conhecidas da solução padrão contendo EE2 é adicionada na amostra de água. As respostas, antes e depois das adições, foram medidas e, posteriormente, usadas para determinação da concentração do analito. Essa concentração é o ponto de intersecção da curva analítica no eixo das concentrações que é calculado pela equação da curva analítica.<sup>69</sup> Esse experimento foi utilizado para se obter os valores de recuperação na amostra de água em concentrações de 2 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

O eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 também foi utilizado para análise de amostra de urina sintética preparada em água ultrapura de acordo com a seguinte composição relatada na literatura<sup>122</sup>: NaCl (0,146 g), KCl (0,08 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,056 g),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0,112 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,07 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,05 g) e ureia (1,25 g) dissolvidos em 50 mL de água ultrapura. Em seguida, 375  $\mu\text{L}$  desta solução foram adicionados a 25 mL do eletrólito de suporte (tampão de acetato de sódio, pH 4,0) com 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de EE2. A amostra foi utilizada imediatamente após sua preparação para verificar o seu efeito da urina sintética no pico de oxidação do EE2.

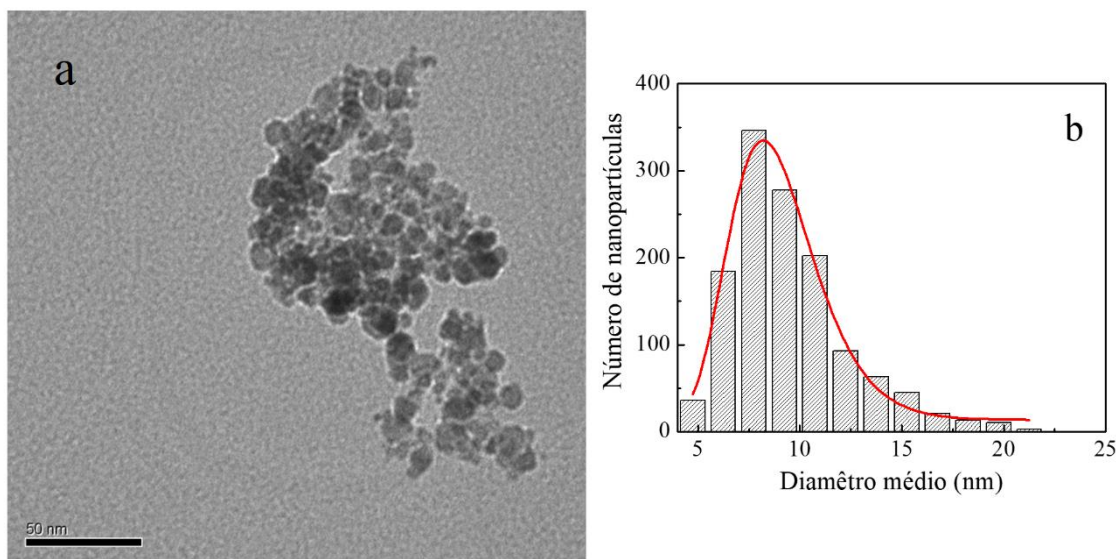
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das nanopartículas de óxido de ferro

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) fornecem dados sobre a morfologia e a distribuição em tamanho das nanopartículas de ION preparadas. A Figura 17a mostra que as ION apresentam uma micrografia típica desse tipo de nanopartículas que independentemente do método de síntese em geral são polidispersas em tamanho e aproximadamente esféricas. A Figura 17b apresenta a distribuição de tamanhos das ION que é um histograma do número de nanopartículas ( $P$ ) em função do seu diâmetro ( $d$ ). A partir do ajuste com uma função log-normal representada pela equação (1)<sup>123,124</sup>:

$$P(d) = \frac{1}{d\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{\ln\left(\frac{d}{d_0}\right)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (1)$$

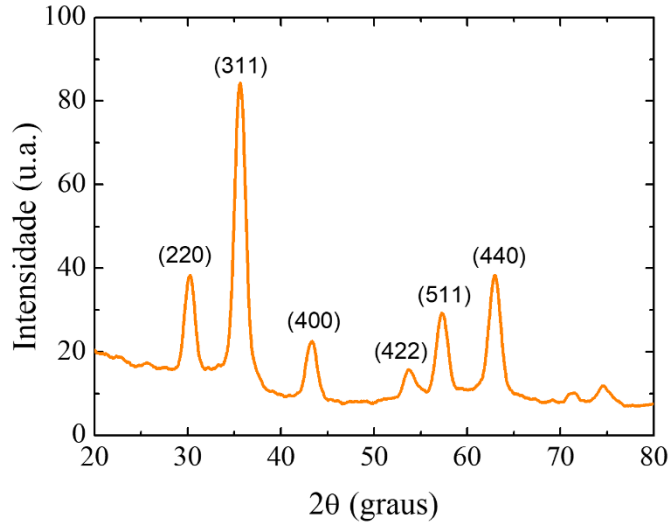
obteve-se o valor do diâmetro médio ( $d_0$ ) das ION que é 8,72 nm e o desvio padrão ( $\sigma$ ) que representa a polidispersão em tamanho das nanopartículas sendo 0,24 nm. Kang et al<sup>119</sup> determinaram um valor próximo de  $d_0$  desse mesmo tipo de ION através de imagens de MET que foi de 8,5 nm porém as nanopartículas eram mais polidispersas com  $\sigma$  de 1,3 nm.



**Figura 17-** (a) Imagem de MET das ION e (b) distribuição de tamanhos das nanopartículas, a linha vermelha representa o ajuste com a função log-normal.

A difração de raios-X é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de materiais, fornecendo informações sobre estruturas cristalinas. Na Figura 18 é mostrado o

difratograma de raio-x das ION mostrando os picos típicos dos planos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) e (4 4 0) presentes na rede cristalina cúbica com estrutura de espinelho inverso de óxido de ferro<sup>125</sup>.



**Figura 18-** Difratograma de raios-x das ION.

Com a largura a meia altura do pico de difração mais intenso ( $\beta$ ) é possível calcular o diâmetro médio das nanopartículas ( $d_{rx}$ ) através da equação (2) de Scherrer<sup>126</sup>:

$$d_{rx} = \frac{k \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2)$$

onde,  $k$  é uma constante associada a geometria que para nanopartículas aproximadamente esféricas é igual a 0,89,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente (1,5418 Å),  $\theta$  é o ângulo de difração em radiano (0,31). O diâmetro encontrado é 8,1 nm, valor próximo ao diâmetro determinado anteriormente por MET.

A distância entre dois planos de átomos adjacentes e paralelos, isto é, distância interplanar ( $d_{hkl}$ ) na estrutura das ION é 2,526 Å, valor obtido com a lei de Bragg<sup>127</sup> mostrada na equação (3):

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (3)$$

em que,  $n$  é a ordem da reflexão admitida como 1.

Para estruturas cristalinas com simetria cúbica, a distância interplanar pode ser relacionada ao parâmetro de rede ( $a$ ) e os índices de Miller ( $h k l$ ) do pico mais intenso pela equação(4)<sup>127</sup>:

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (4)$$

O valor do parâmetro de rede estimado foi 8,377 Å, que está entre o valor padrão para magnetita (8,397 Å) e maguemita (8,352 Å), sugerindo que as ION preparadas sejam uma mistura de ambas as fases<sup>128</sup>.

Para verificar a estabilidade das ION na dispersão e confirmar que são aniônicas, possibilitando a adsorção no eletrodo modificado por LbL, determinou-se o potencial zeta, que se refere à carga elétrica na superfície das nanopartículas. O potencial zeta das ION é  $+46 \pm 1$  mV, valor acima de +30 mV que é considerado um potencial zeta suficiente para garantir a repulsão entre nanopartículas, evitando a agregação e perda de estabilidade cinética.<sup>129</sup> As ION são dispersas em meio ácido o que garante a formação de grupos protonados de oxihidróxidos de ferro na superfície promovendo assim um potencial zeta positivo.

O diâmetro hidrodinâmico (DH) e o índice de polidispersividade (PDI) das ION foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz apresentando valores de  $57,05 \pm 1,25$  nm e  $0,28 \pm 0,04$  nm, nota-se que o DH é maior que o diâmetro médio das nanopartículas obtidos anteriormente por MET e DRX (média de 8,41 nm), isso porque o DH leva em conta os contra-íons e a camada de solvatação ao redor das nanopartículas. No geral, nanopartículas com PDI maior que 0,1 são considerados polidispersas, o que é esperado para as ION.<sup>130</sup>

## 5.2 Caracterização morfológica e estrutural do filme NiTsPc/ION

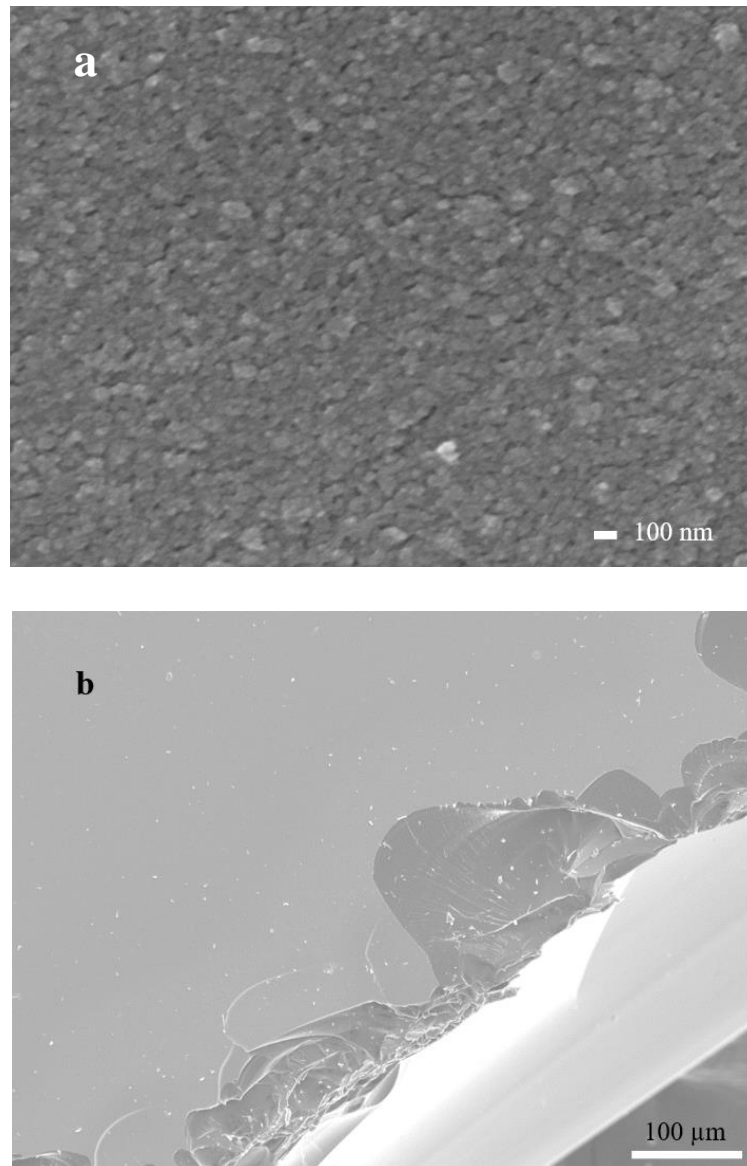
A seguir, serão apresentados os resultados quanto à modificação do eletrodo com ION/NiTsPc, comprovada e avaliada com MEV, AFM, espectroscopia de absorção no UV-vis e espectroscopia Raman.

### 5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de raios X por dispersão de energia

Na Figura 19a é apresentada a imagem de MEV obtida para o filme preparado de 10 bicamadas de ION/NiTsPc no substrato de ITO. A presença das ION é confirmada por estruturas aproximadamente esféricas e com certo nível de aglomeração como o observado nas imagens de MET das nanopartículas. Além disso, nota-se que toda a superfície é recoberta pelo filme.

A aglomeração das ION é esperada para um filme obtido após vários ciclos de deposição. É de conhecimento que os filmes LbL são formados por um mecanismo que envolve,

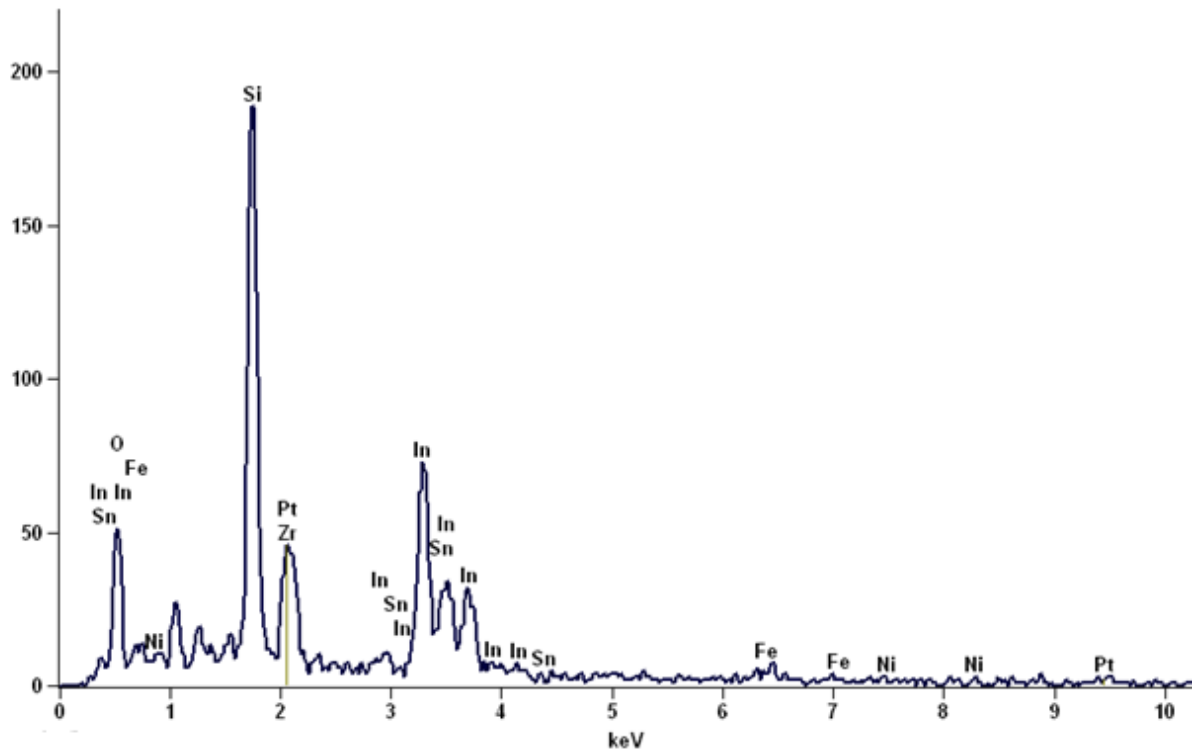
primeiramente, a nucleação da superfície do substrato com pequenos núcleos. Posteriormente, os vazios entre os núcleos são preenchidos gradativamente com a deposição de mais material. Apesar da repulsão eletrostática entre as nanopartículas imposta por suas cargas superficiais positivas, as interações dipolares superam esta repulsão.<sup>131</sup> Na Figura 19b é mostrada a borda do eletrodo, onde é possível diferenciar o substrato de ITO e um filme homogêneo e contínuo de ION/NiTSPc.



**Figura 19**-Imagens de MEV de (a) filme ITO(NiTSPc/ION)-10 e (b) borda do substrato ITO.

O espectro de EDX (Figura 20) confirma a modificação do eletrodo, com a presença de oxigênio de todos os nanomateriais e do substrato, ferro das ION, níquel da NiTSPc, índio, estanho e silício do substrato de ITO ( $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ ) e a platina da metalização. A Tabela 5 mostra a porcentagem de composição em massa e átomos de cada elemento. Aproximadamente 51%

dos átomos presentes são de oxigênio e 39% da massa total é do elemento índio que tem massa atômica menor apenas que estanho e platina.



**Figura 20-** Espectro de EDX do filme ITO(NiTSPc/ION)-10.

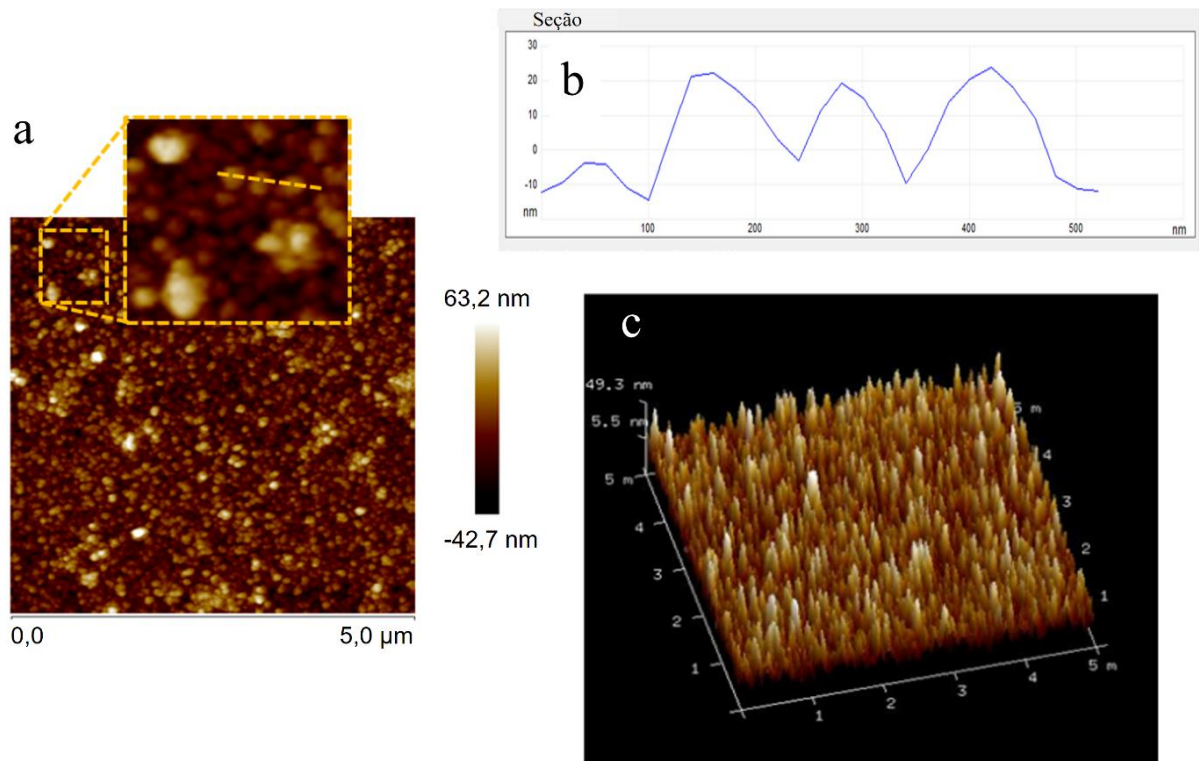
**Tabela 5-** Porcentagem em massa e átomos dos elementos presentes no filme ITO(NiTSPc/ION)-10.

Elemento	Massa (%)	Átomos (%)
Oxigênio	18,33	50,84
Silício	16,18	25,55
Ferro	1,35	1,08
Níquel	0,35	0,26
Índio	39,00	15,07
Estanho	9,72	3,63
Platina	14,48	3,29

### 5.2.2 Microscopia de força atômica

A Figura 21a exibe uma imagem de AFM do filme (NiTsPc/ION)-10, que mostra uma morfologia globular, com poros estabelecidos nos vazios deixados entre as ION esféricas. Esta

característica é reproduzida sistematicamente em filmes com diferentes números de bicamadas, conforme é apresentado na Figura do anexo 1 que mostra as imagens 2D e 3D desses filmes. A Figura 21b apresenta o perfil da superfície traçado através de uma amplificação da imagem de AFM da Figura 21a revelando três agregados de ION, cada um com aproximadamente 20 nm de altura e 130 nm de diâmetro, a imagem 3D do filme na Figura 21c permite visualizar melhor os relevos e os poros provocados por esses aglomerados, em toda a superfície avaliada.

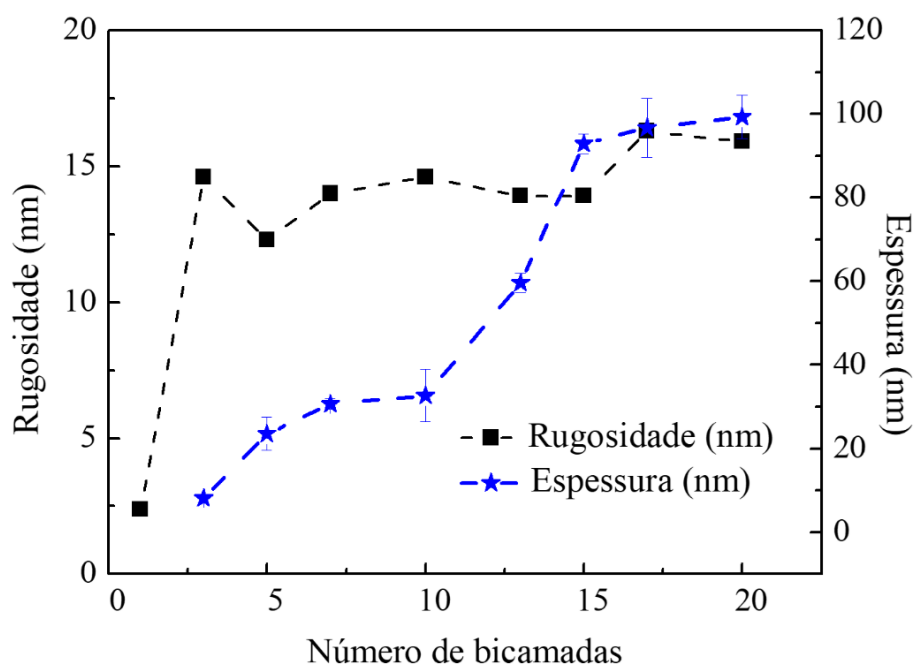


**Figura 21-** (a) Imagem de AFM da amostra ITO(NiTSPc/ION)-10, (b) traço de perfil de superfície da visualização ampliada de (a) e (c) imagem 3D da mesma amostra.

A espessura e a rugosidade do filme (medidas por AFM) em função do número de bicamadas é exibida na Figura 22. Observa-se que a rugosidade aumenta até o filme com 3 bicamadas e depois não varia muito, isso porque as ION contribuem para uma morfologia porosa, com a adsorção de partículas individuais e agregadas que ocupam os espaços vazios a cada deposição, ficando assim cada vez mais empacotadas e refletindo também no aumento não linear da espessura com o número de bicamadas. Apesar disso, o método proposto permite controlar a quantidade de materiais eletroativos no filme pelo número de bicamadas depositadas, o que é desejável para a modificação do eletrodo. Embora a rugosidade não



aumente nas deposições além de 3 bicamadas, o aumento da espessura confere maior atividade eletroquímica (Figura 36d) mediante a adsorção de mais material eletroativo.



**Figura 22-** Rugosidade e espessura do filme em função do número de bicamadas de (NiTsPc/ION) depositadas. As barras de erro nos dados de espessura representam o desvio padrão para medições realizadas em três pontos de amostra diferentes.

### 5.2.3 Espectros de absorção no UV-vis

A Figura 23a apresenta os espectros de UV-vis da solução de NiTsPc, da suspensão de ION e do filme de (NiTsPc/ION)-10 depositados no quartzo. Para a suspensão de ION é mostrado apenas uma banda de absorção em 360 nm, atribuída ao processo de transferência eletrônica  $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$  na estrutura de espinélio invertido do cristal.<sup>120,125</sup> O espectro referente a solução de NiTsPc (Figura 23a, linha verde) mostra duas bandas principais que são atribuídas às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ : a banda Q centrada em cerca de 625 nm, que é responsável pela cor azul ou verde do composto, e a banda B (ou banda Soret) centrada em cerca de 335 nm característica dos anéis porfirínicos.

A posição da banda Q é modificada para algumas medidas pela natureza do íon central e pela presença de substituintes, já que estes podem modificar o nível de energia do HOMO que produz um desvio para o vermelho (batocrômicas) da banda Q.<sup>132,133</sup> Além disso, essa banda pode ser desdobrada, devido à ocorrência de espécies diméricas e monoméricas apresentadas nos espectros nos comprimentos de onda em torno de 625 e 670 nm, respectivamente para a

solução de NiTsPc. Geralmente isto é representado como uma associação coplanar de anéis progredindo de monômeros para dímeros e agregados de ordem superior, devido ao acoplamento extensivo do sistema de elétrons  $\pi$  dos anéis adjacentes, é comum essa agregação ser do tipo H em que as moléculas empilham-se umas sobre as outras, com momento de dipolo de transição orientado a 90 graus do eixo de empilhamento.<sup>134-136</sup> O íon Ni(II) no centro da molécula, no entanto, limita a aproximação de duas moléculas NiTsPc diferentes para empilhamento  $\pi$ . Em vez disso, as moléculas de NiTsPc são conectadas umas às outras por meio de pontes oxo de Ni(II)-O-Ni(II).<sup>134</sup>

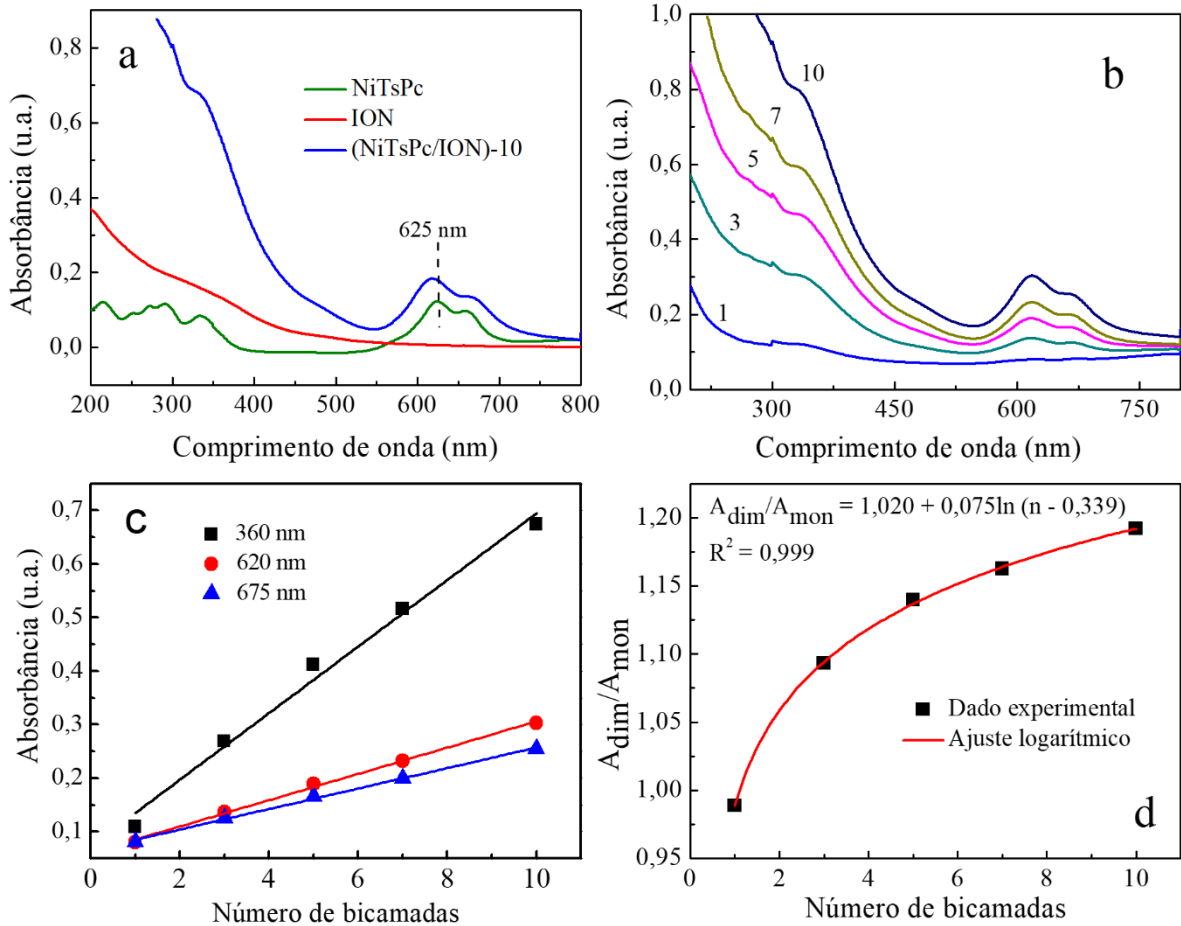
Portanto, para os filmes de NiTsPc/ION é suposto que também tenha a existência de pontes de Fe(III)-O-Ni(II). Na literatura é relatado esse tipo de ligação entre metalofalocianinas e óxidos de ferro, Chen et al. por exemplo preparam nanocompósitos de tetracarboxifalocianina de cobalto ligadas a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/microesferas de quitosana para a degradação de corante.<sup>137</sup> Após análise estrutural realizada por espectroscopias FT-IR, UV-Vis e XPS, eles concluíram que as moléculas de ftalocianina estavam ligadas a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações de coordenação estabelecidas por pontes Co(II)-O-Fe(III). Silva et al. estudaram a adsorção de ZnTsPc em nanopartículas de maguema por diferentes métodos de espectroscopia e admitiram a possibilidade de ligação covalente entre esses dois materiais.<sup>138</sup>

Na Figura 23a linha azul, observa-se que o espectro do filme de (NiTsPc/ION)-10 apresenta as bandas do espectro da suspensão de ION e da solução de NiTsPc, porém a banda Q é deslocada 5 nm para o azul, efeito associado à agregação das moléculas de NiTsPc devido as interações já citadas.

A Figura 23b mostra os espectros de UV-vis do substrato de quartzo com número variado de bicamadas de (NiTsPc/ION)-n, com n = 1, 3, 5, 7 e 10. Verifica-se um aumento linear da absorvância com o número de bicamadas depositadas (Figura 23c) nos comprimentos de onda de 360 nm, 620 e 675 nm, com r<sup>2</sup> de 0,986; 0,996 e 0,996 para os respectivos comprimentos de onda. Esse aumento linear sugere que a quantidade de material adsorvido é sempre a mesma à cada bicamada depositada permitindo o controle em escala nanométrica da arquitetura do filme. Este comportamento tem sido observado por diferentes autores quando fabricam filmes por LbL com interação eletrostática entre NiTsPc e poli(anilina) dopada<sup>139</sup>, nanopartículas de ouro revestidas com poli(cloridrato de alilamina)<sup>140</sup>, quitosana<sup>141</sup>, argila montmorillonita<sup>142</sup> e polímero de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano.<sup>143</sup>

A dependência da razão entre as absorvâncias consideradas para o dímero ( $A_{dim}$ ) e o monômero ( $A_{mon}$ ) de NiTsPc em função do número de bicamadas do filme de NiTsPc/ION é

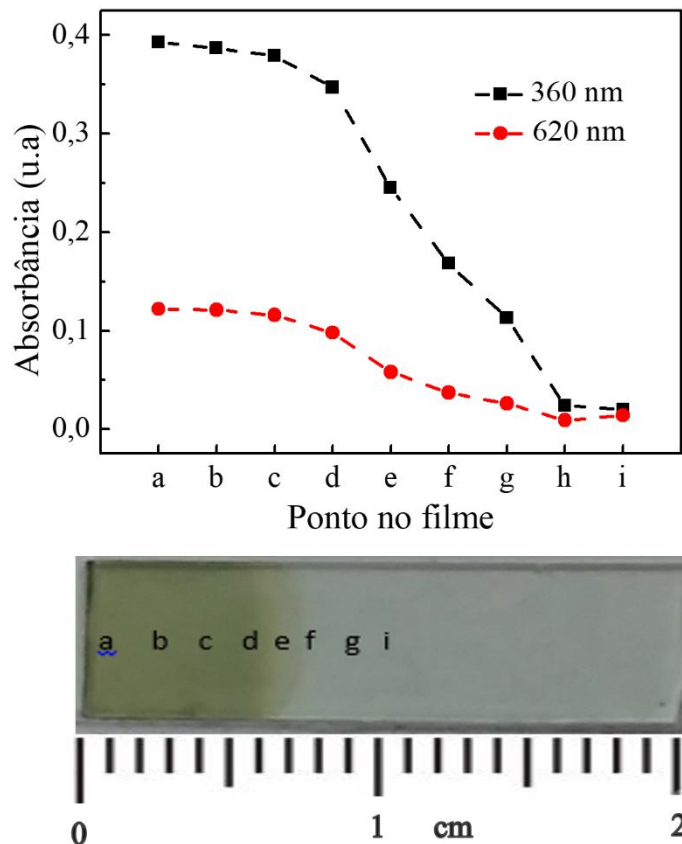
apresentada na Figura 23d. Observa-se que esse valor aumenta a cada bicamada depositada de forma logarítmica (equação inserida na Figura 23d), sugerindo que, nas primeiras bicamadas, as moléculas de NiTsPc encontram-se mais individualizadas, mas se agregam à medida que mais bicamadas vão sendo depositadas.



**Figura 23-**Espectros de absorção de UV-vis de (a) solução de NiTsPc, suspensão de ION, filme de (NiTsPc/ION)-10 e (b) dos filmes com 1, 3, 5, 7 e 10 bicamadas de NiTsPc/ION depositadas no quartzo. (c) Relação linear entre absorbância e número de bicamadas depositadas. (d) Razão entre as absorbâncias consideradas para o dímero ( $A_{dim}$ ) e o monômero ( $A_{mon}$ ) de NiTsPc em função do número de bicamadas de NiTsPc/ION.

Com espectroscopia de absorbância de UV-Vis também foi avaliada a homogeneidade do filme de (NiTsPc/ION)-10 depositado no ITO. A Figura 24 mostra as absorbâncias em 360 nm e 620 nm para diferentes pontos do filme que estão marcados na imagem fotográfica abaixo do gráfico. Nota-se que a absorbância permanece praticamente constante até o ponto c que ainda contém filme, evidenciado que o filme cobre toda superfície, como mostrado nas imagens de microscopia. Para os outros pontos a absorbância cai, pois representam a superfície do ITO que

não foi completamente imersa na solução/suspensão dos materiais na LbL, lembrando que esses pontos são recobertos com fita e portanto, não influenciam nas medidas eletroquímicas.

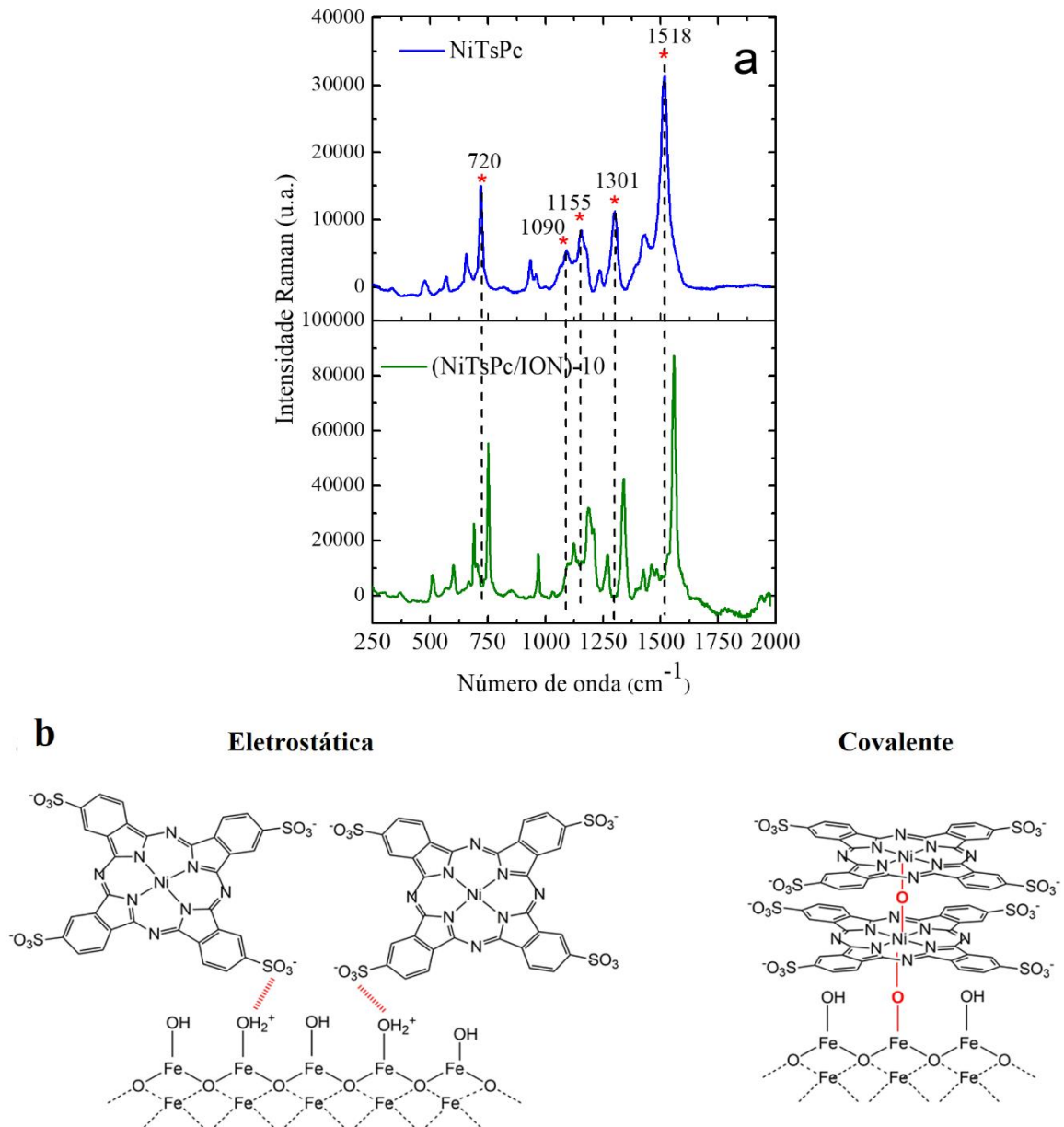


**Figura 24-** Absorvâncias em 360 nm e 620 nm para os diferentes pontos do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 apresentado na imagem fotográfica abaixo do gráfico.

#### 5.2.4 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman da solução da NiTsPc e do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 são comparados na Figura 25a. Os espectros foram obtidos usando excitação de 632,8 nm, que está em ressonância com a banda-Q da NiTsPc e então aumenta a relação sinal/ruído. Os principais modos vibracionais Raman e esperados para NiTsPc, de acordo com a literatura<sup>139,144</sup>, são observados em ambas as amostras; eles são marcados com asterisco e listados na Tabela 6. Comparativamente, observa-se uma mudança sistemática de todos os modos vibracionais para números de onda mais altos, para o filme (NiTsPc/ION)-10. Os deslocamentos observados são atribuídos ao fortalecimento das ligações químicas das moléculas de NiTsPc causado pelas interações entre si devido à formação de agregados, bem como pela interação com ION. Enquanto o deslocamento da banda de estiramento  $-SO_3^-$  é atribuído à complexação iônica com

grupos oxihidróxi de Fe(III) carregados positivamente na superfície das ION, o deslocamento de todos os outros modos pode ser atribuído à interação entre Ni(II) e Fe(III) por meio de pontes oxo comprovando o que foi proposto para os espectros de UV-Vis. Conclui-se então que a montagem LbL dos filmes NiTsPc/ION é impulsionada tanto pela interação eletrostática quanto pela coordenação. O esquema apresentado na Figura 25b ilustra os modos possíveis de interação entre NiTsPc e ION. Esta estrutura supramolecular incomum é considerada indispensável para a eletrooxidação efetiva de EE2, como será mostrado no estudo eletroquímico do tópico 5.4.



**Figura 25-** (a) Espectros de Raman da solução de NiTsPc e do filme de (NiTsPc/ION)-10, obtidos com excitação em 632,8 nm. (b) Modelos propostos para as interações eletrostáticas e covalentes (via ponte oxo) entre NiTsPc e ION no filme de NiTsPc/ION.

**Tabela 6-** Atribuições das bandas dos espectros de Raman para a solução de NiTsPc e o filme (NiTsPc/ION)-10.

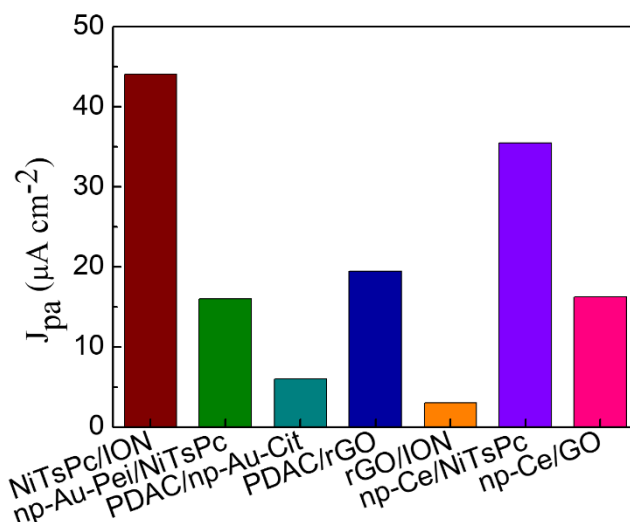
NiTsPc	(NiTsPc/ION)-10	Deslocamento ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
720	751	+31	Vibração macrociclo
1090	1124	+34	Estiramento $-\text{SO}_3^-$
1155	1184	+29	Deformação angular C-H
1301	1338	+37	N-Ni estiramento isoindol; Deformação angular no plano C-N-C
1518	1559	+39	C=C, C=N estiramento pirrol; Estiramento C-N-C; Expansão do pirrol; Deformação angular no plano C-H

### 5.3 Escolha do eletrodo de trabalho

Eletrodos de ITO modificados com diferentes combinações de nanomateriais, de conhecida atividade eletrocatalítica foram testados com VPD para a escolha do mais sensível na detecção de EE2. Os nanomateriais utilizados foram NiTsPc, ION, óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reduzido (rGO), nanopartículas de óxido de Cério (np-Ce) e ouro com citrato ou polímero ramificado poli(etileno imina) (np-Au-Cit ou np-Au-PEI), além disso polímeros sem eletroatividade (PDAC e PSS) estiveram presentes em alguns eletrodos para avaliar a eficiência individual dos nanomateriais na oxidação de EE2. Para fins de simplificação nas comparações, apenas filmes com 10 bicamadas foram testados, pois número menor de bicamadas permite menos adsorção de material e menor resistência do filme na aplicação de potencial, para maiores números de bicamadas o tempo de preparo dos eletrodos seria maior.

A Figura 26 apresenta a densidade de corrente de pico de oxidação do EE2 para os eletrodos de NiTsPc/ION, np-Au-PEI/NiTsPc, PDAC/np-Au-Cit, PDAC/rGO, rGO/ION, np-Ce/NiTsPc, np-Ce/GO, observa-se que o eletrodo mais sensível é o de NiTsPc/ION sendo o escolhido para a detecção de EE2. Além disso, eletrodos de np-Au-PEI/np-Au-Cit, GO/ION, PSS/np-Ce, PDAC/GO também foram avaliados, porém os voltamogramas gerados não apresentaram pico de oxidação referente ao EE2. Portanto, no próximo tópico serão apresentados as atribuições dos picos presentes nos voltamogramas obtidos com eletrodo de

NiTsPc/ION e também será elucidado o mecanismo de oxidação do EE2 nesses eletrodos, apresentando o papel de cada material nesse processo.

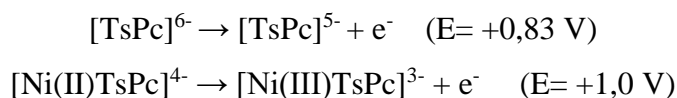


**Figura 26-** Densidade de corrente de pico anódico para voltamogramas de pulso diferencial de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de EE2 oxidado com eletrodos de ITO modificados com diferentes nanomateriais. O eletrólito de suporte utilizado foi acetato de sódio pH 4,0; amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

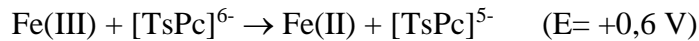
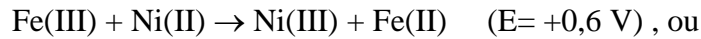
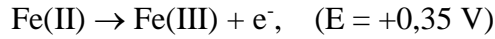
#### 5.4 Identificação e caracterização dos processos eletroquímicos

A Figura 27 apresenta os voltamogramas cíclicos dos eletrodos de ITO, ITO(PSS/ION)-10, ITO(PDAC/NiTsPc)-10 e ITO(NiTsPc/ION)-10 na ausência (—) e na presença (—) de EE2 na concentração de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Na Figura 27a, quando a leitura é realizada com o eletrodo de ITO sem filme apenas no eletrólito de suporte, nenhum pico é observado. Após a modificação com o filme de 10 bicamadas de PSS/ION ocorre no voltamograma cíclico (Figura 27b) o aparecimento de um pico anódico (I) em 0,35 V e um pico catódico (II) em 0,19 V, atribuídos a oxidação/redução dos oxihidróxidos de Fe(II) presentes na superfície das ION<sup>120</sup>. Estes picos diminuem quando a leitura é realizada na presença de EE2, sugerindo interação entre EE2 e as ION, o que as torna menos disponível para o processo redox.

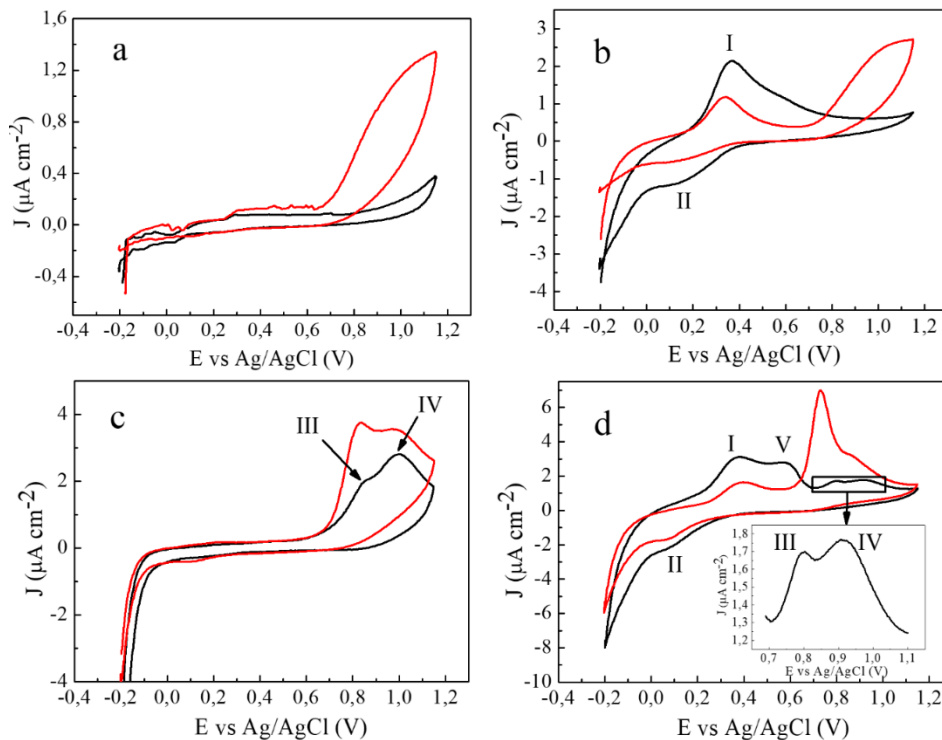
O eletrodo ITO(PDAC/NiTsPc)-10 em tampão acetato com pH 4,5 apresenta um voltamograma (Figura 27c) com dois picos anódicos em potencial de 0,83 V para o pico III que é referente ao processo de oxidação do anel da ftalocianina e 1 V para o pico IV relacionado à oxidação do níquel, conforme as seguintes reações<sup>145</sup>.



Estes quatro picos apresentados também se encontram no voltamograma cíclico do eletrodo NiTsPc/ION em tampão acetato de sódio pH 4,5 mostrado na Figura 27d. Além desses é observado um terceiro em +0,6 V (pico V), referente à transferência de carga entre NiTsPc e ION, confirmada posteriormente com o estudo da variação da corrente deste pico em função da velocidade de varredura. As seguintes semi-reações são propostas para essa transferência de carga:



Como evidenciado anteriormente pelos resultados dos espectros de Raman e UV-Vis, o filme de NiTsPc/ION é formado por interação eletrostática e covalente, sugere-se que quando as ION interagem eletrostaticamente com as moléculas de NiTsPc através dos grupos sulfônicos, os íons de Fe(II) e Ni(II) ficam disponíveis para oxidar no potencial de +0,35V e +1,0 V, respectivamente. Por outro lado, quando as ION e as NiTsPc estão ligadas através da ponte Fe(III)-O-Ni(II) a transferência de carga conforme as semi-reações no potencial de +0,6 V devem ocorrer.



**Figura 27-** Voltamogramas cíclicos de (—) tampão acetato de sódio pH 4,5 e (—) EE2 na concentração de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão acetato de sódio pH 4,5, adquiridos com os eletrodos de ITO (a) sem filme e modificados com 10 bicamadas de (b) PSS/ION, (c) PDAC/NiTsPc e (d) NiTsPc/ION. Todos voltamogramas registrados na velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



Ainda na Figura 27, para as leituras realizadas na presença de EE2, verificou-se que para o substrato de ITO sem filme e modificado com o filme (PSS/ION)-10, ocorre o aumento de densidade de corrente em torno de +0,7 V, formando uma ondulação até +1,2 V, ou seja, esses eletrodos provocam a oxidação do EE2, porém sem o surgimento de um pico bem definido. Nos eletrodos de ITO(PDAC/NiTsPc)-10 e ITO(NiTsPc/ION)-10, a oxidação do EE2 provoca o surgimento de um pico em torno de +0,8 V, mesmo potencial do processo de oxidação do anel da NiTsPc, porém com densidade de corrente maior.

O eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 foi o que apresentou maior densidade de corrente de pico sendo aproximadamente 3 vezes maior que o pico de oxidação do EE2 no eletrodo de ITO(PDAC/NiTsPc)-10, demonstrando assim que tanto as ION quanto as moléculas de NiTsPc tem papel fundamental para o aumento da sensibilidade do eletrodo.

Foram obtidos voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura do potencial com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 (Figura 28), no eletrólito de suporte tampão acetato na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 para se obter mais informações relacionados ao processo de oxidação como a cinética de transferência de carga e o número de elétrons envolvidos nas reações.

Para os picos referentes à oxidação da NiTsPc (+0,83 e +1 V) na Figura 28a, a forma dos picos variam com a velocidade não sendo definido em velocidades a partir de 25 mV s<sup>-1</sup>, o que sugere que esses processos são lentos e irreversíveis. A redução da NiTsPc não foi detectada, embora contribuições anteriores tenham observado os picos de redução. A principal diferença aqui é o uso de um polieletrólito (PDAC) muito mais forte em contraste com o poli(cloridrato de alilamina) e quitosana usados por Crespilho et al.<sup>141</sup> e Alencar et al.<sup>145</sup>

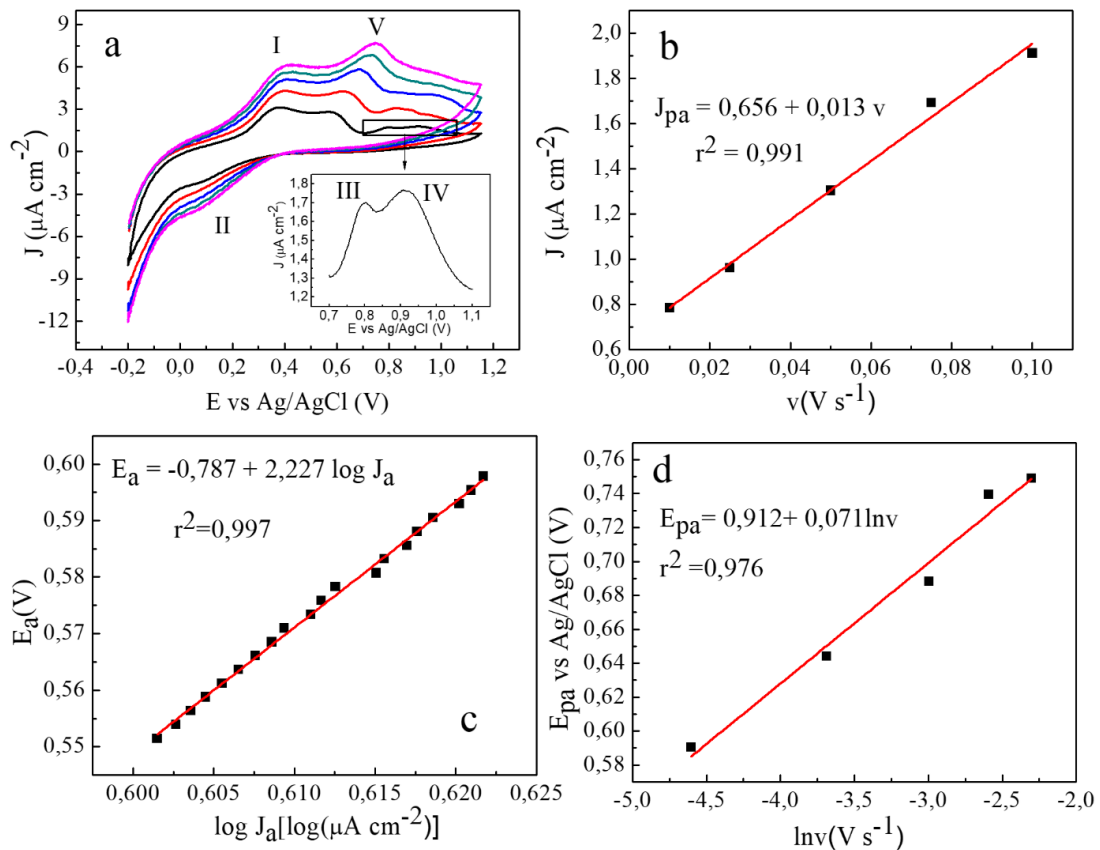
O pico de transferência de carga entre ION e NiTsPc (+0,6 V) varia o potencial ficando mais positivo com o aumento da velocidade demonstrando também ser um processo irreversível. Os picos anódico (+0,35 V) e catódico (+0,19 V) das ION não apresentam variação do potencial de pico com o aumento da velocidade, e tem uma diferença de potencial de pico anódico e catódico de 0,16 V sendo considerado portanto, um processo quase-reversível.<sup>75</sup>

Na Figura 28b é mostrada a relação entre densidade de corrente de pico de oxidação ( $J_{pa}$ ) e a velocidade de varredura ( $v$ ) para o pico em +0,6 V da interação entre ION e NiTsPc. A relação obtida foi linear com  $r^2=0,991$ , mostrando, portanto, que é um processo controlado por transferência de carga e não por difusão. A tentativa de ajuste com um modelo de difusão, linearidade da relação  $J_{pa}$  vs  $v^{1/2}$ , resultou num coeficiente de determinação inferior,  $r^2 =0,939$ , confirmando o modelo de transferência de carga.

Para o cálculo do número de elétrons envolvidos nessa etapa de oxidação, primeiramente realizou-se o cálculo do coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ) através do gráfico de Tafel apresentado na Figura 28c. Esse gráfico é representado pelo potencial ( $E_a$ ) *versus*  $\log J$  e referente à parte inicial da curva de oxidação do pico em +0,6 V realizado na velocidade de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . O valor de  $\alpha$  é então calculado pela equação 5:

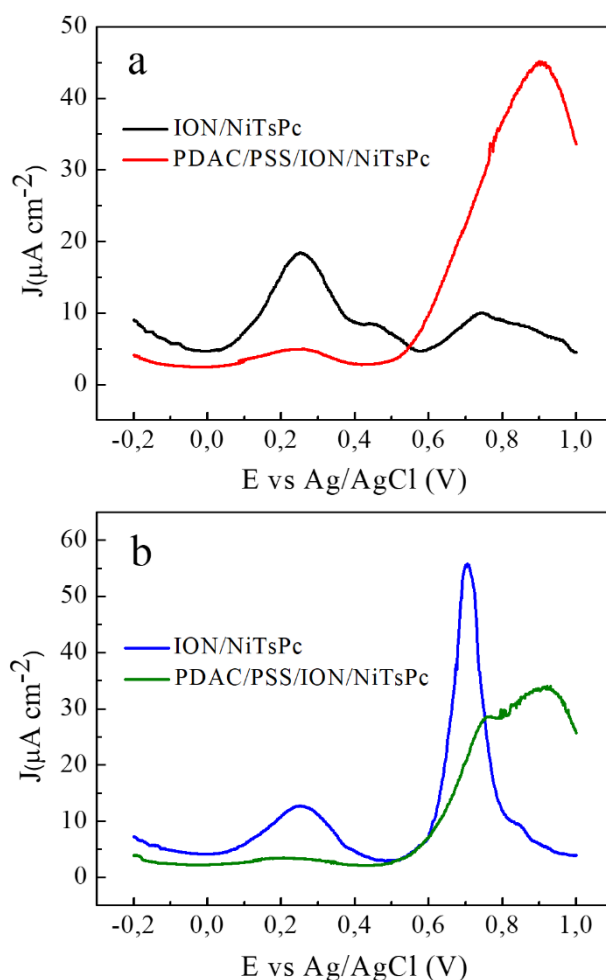
$$b = \frac{2,303RT}{(1-\alpha)F} \quad (5)$$

em que,  $b$  é a inclinação do gráfico de  $E_a$  em função de  $\log J_a$ , cujo valor foi de 2,227 (equação inserida na Figura 28c),  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,31 \text{ J K mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura (298 K) e  $F$  é a constante de Faraday ( $96500 \text{ C mol}^{-1}$ ). O valor de  $\alpha$  encontrado é 0,973.<sup>146</sup> A inclinação da reta de  $E_{pa}$  vs  $\ln v$  (Figura 28d) é igual a  $2,303RT/\alpha nF$  em que  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação que foi 1 para a transferência de carga entre ION e NiTsPc.<sup>147</sup>



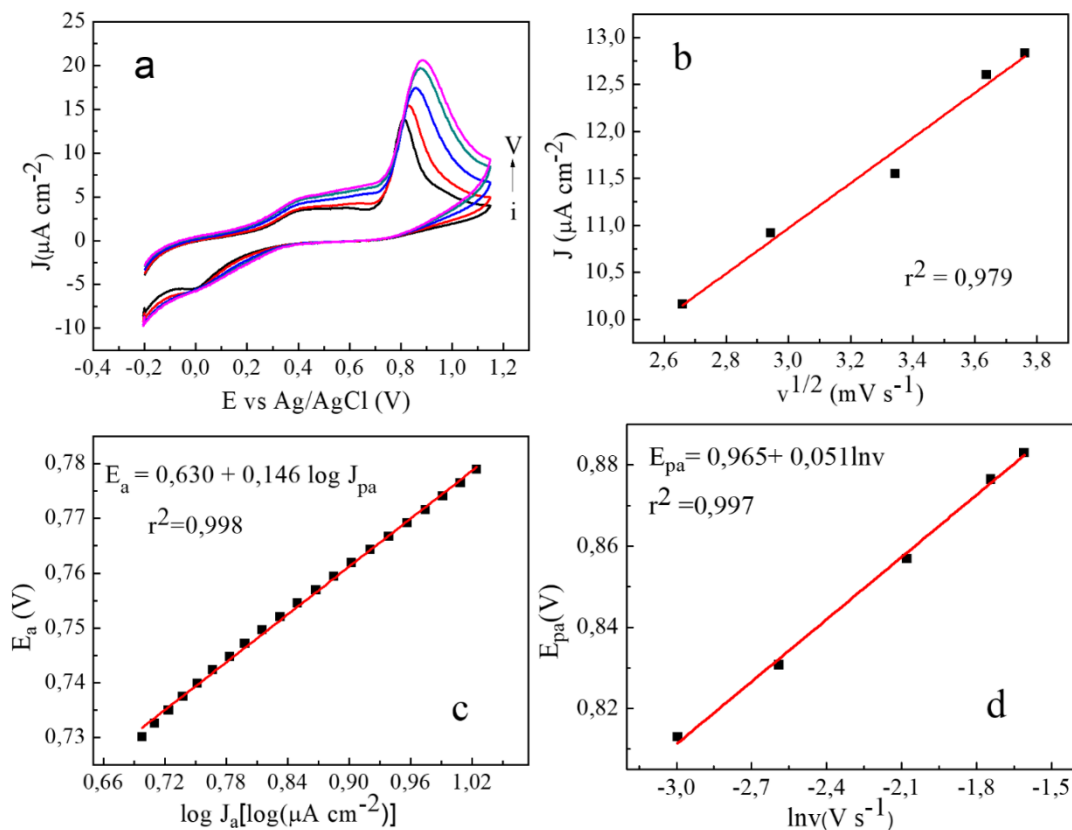
**Figura 28-** (a) Voltamograma cíclico do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 adquiridos nas velocidades de varredura de (i) 10 (ii) 25 (iii) 50 (iv) 75 e (v)  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (b) Variação da densidade de corrente de pico anódico ( $J_{pa}$ ) em função da velocidade de varredura ( $v$ ) (c) Gráfico de Tafel na velocidade de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  (d) Dependência do potencial de pico ( $E_{pa}$ ) em relação a  $\ln v$ .

Para que ocorra a transferência de carga entre ION e NiTsPc é necessário o contato das duas espécies, isso foi avaliado através da comparação de eletrodos de ITO(ION/NiTsPc)-10 e ITO(PDAC/PSS/ION/NiTsPc)-10, os polímeros isolantes entre as camadas provocou o desaparecimento do pico em +0,6 V, que nos voltamogramas de pulso diferencial foi deslocada para um potencial em torno de +0,5 V como mostrado na Figura 29a, enquanto que o pico da NiTsPc em torno de +0,9 V é bem maior para o filme com os polímeros, ou seja, embora a espessura de uma bicamada de PDAC/PSS seja inferior a 5 nm<sup>148</sup>, é suficiente para evitar o estabelecimento da ponte oxo e a transferência de carga entre ION e NiTsPc, assim mais moléculas desta fica disponível para oxidação. Além disso, a presença dos polímeros provocou menor eficiência na oxidação do EE2 como pode ser verificado na Figura 29b, essa oxidação, portanto, é dependente do contato de ION e NiTsPc.



**Figura 29-** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com os eletrodos de ITO modificados com (ION/NiTsPc)-10 e (PDAC/PSS/ION/NiTsPc)-10 em (a) eletrólito de suporte tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) em solução de EE2 na concentração de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  usando tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>.

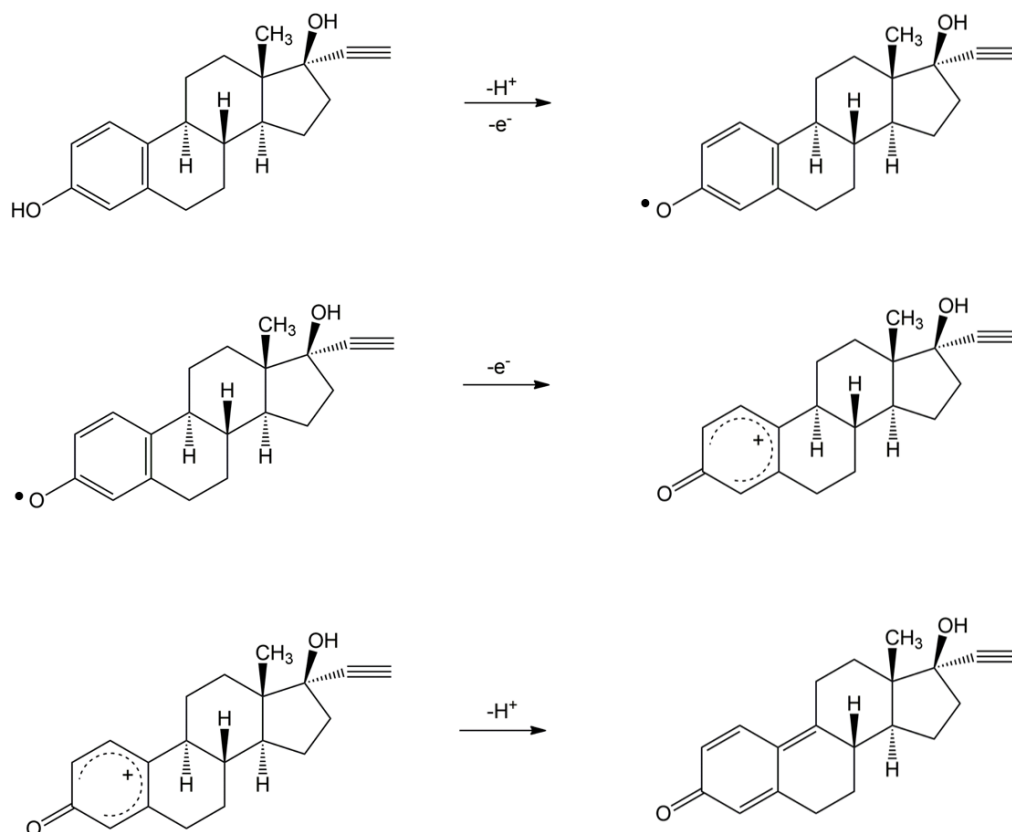
Os voltamogramas cíclicos registrados com o eletrodo (NiTsPc/ION)-10 em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 com  $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de EE2 adquiridos em diferentes velocidades são apresentados na Figura 30. Nota-se que a oxidação do EE2 é irreversível (Figura 30a) e controlada por transferência de carga e difusão, pois, o valor de  $r^2 = 0,979$ , foi o mesmo para a relação  $J_{pa} \text{ vs } v$  e para  $J_{pa} \text{ vs } v^{1/2}$  este apresentado na Figura 30b. O coeficiente de transferência de carga é 0,59 e o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do EE2 é 2 e foram calculados conforme o procedimento apresentado anteriormente, o gráfico de Tafel e de  $E_{pa}$  em função de  $\ln v$  são apresentados nas Figuras 30c e 30d. Este número de elétrons está de acordo com o apresentado na literatura.<sup>20,149</sup>



**Figura 30-**(a) Voltamograma cíclico eletrodo ITO(ION/NiTsPc)-10 em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5 com  $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de EE2 adquiridos nas velocidades de varredura de (i) 50 (ii) 75 (iii) 125 (iv) 175 (v)  $200 \text{ mV s}^{-1}$ . (b) Variação da densidade de corrente de pico anódico ( $J_{pa}$ ) em função da velocidade de varredura ( $v$ ). (c) Gráfico de Tafel na velocidade de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (d) Dependência do potencial de pico ( $E_{pa}$ ) em relação a  $\ln v$ .

O mecanismo de oxidação do estradiol (E2) foi proposto por Ngundi et al.<sup>150</sup>. Como a estrutura do EE2 é similar à do E2, diferindo apenas por um grupo funcional ligado ao anel de ciclopentano, especificamente em C17 (um grupo hidroxila para o E2, e hidroxila e etinil para

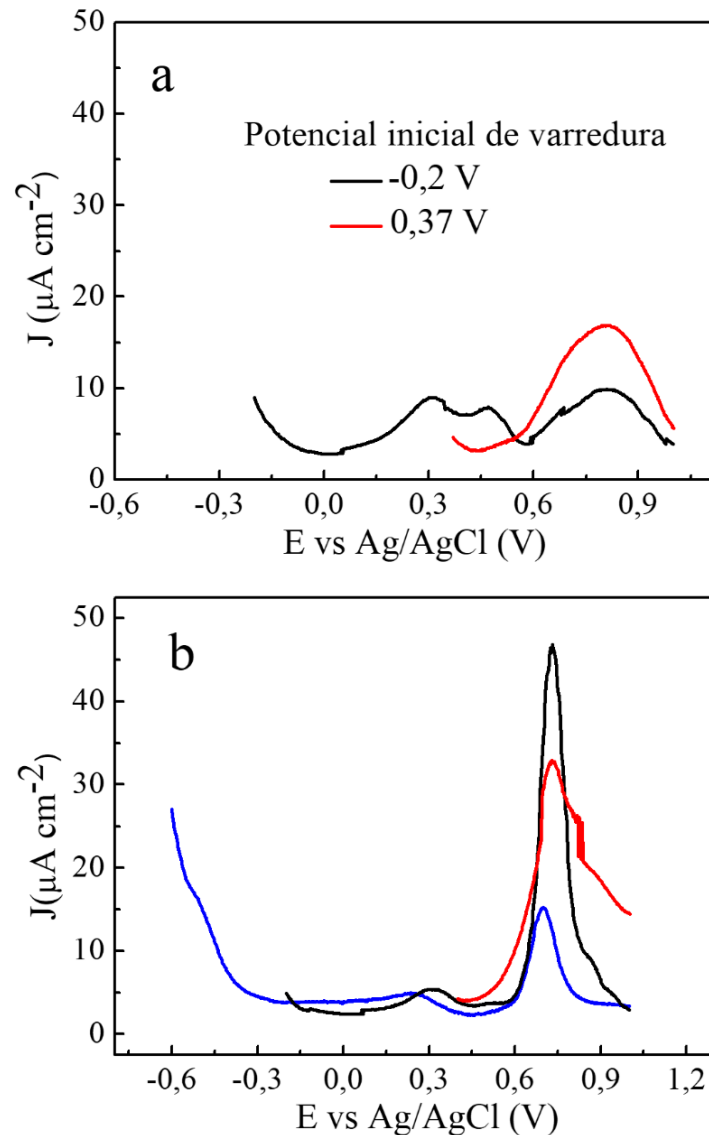
o EE2)<sup>20</sup>, sugere-se que ambos oxidam pelo mesmo mecanismo apresentado na Figura 31, em que mostra oxidação inicial do etinilestradiol produzindo um radical fenóxi, este é posteriormente oxidado a um íon fenoxônio, seguido por uma reação química, para formar uma cetona, e isso resulta em um mecanismo de reação EC-EC (eletroquímico-químico-eletroquímico-químico).



**Figura 31-** Mecanismo de reação de oxidação do EE2.<sup>150</sup>

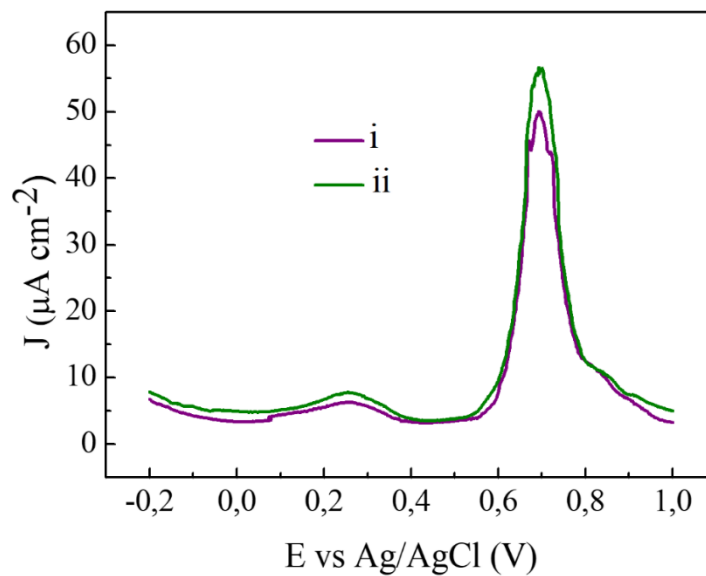
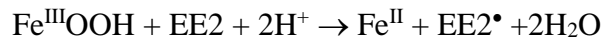
A influência do potencial inicial de varredura e da última camada do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 também foi estudada para se obter mais detalhes da oxidação eletroquímica do EE2 nessa superfície. Com experimentos de VPD realizados com o eletrodo apenas no eletrólito de suporte acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5 com diferentes potenciais iniciais de varredura, observou-se que o pico em +0,5 V referente à transferência de carga entre ION e NiTsPc é dependente do potencial inicial de varredura. Por exemplo, na Figura 32a, é observado que ao iniciar a varredura do potencial em +0,37 V, o sinal em +0,5 V não aparece. Por outro lado, quando a varredura é iniciada em -0,2 V, o pico referente à transferência de carga aparece. O mesmo é observado para a oxidação do EE2 (Figura 32b). A densidade de

corrente de pico para a varredura iniciada em +0,37 V (curva vermelha) é bem menor que aquela obtida com a varredura de potencial iniciada em -0,2 V (curva preta). Contudo, quando a varredura do potencial é iniciada em -0,6 V (curva azul), há a transferência de carga entre ION e NiTsPc, mas a corrente de oxidação do EE2 é a menor de todas. Desse modo, sugere-se que para haver a oxidação eficiente do EE2 com o eletrodo desenvolvido, as ION devem ser previamente oxidadas, o que ocorre quando a varredura de potencial é iniciada em -0,2 V. Entretanto, o potencial inicial não pode ser tão negativo, pois nesse caso há também a redução parcial das ION.



**Figura 32-** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 (a) em eletrólito de suporte tampão acetato de sódio pH 4,5 e (b) em solução de EE2 na concentração de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  iniciando a varredura em diferentes potenciais.

Nos voltamogramas da Figura 33 fica evidente que quando o eletrodo é terminado com ION, a densidade de corrente de pico é cerca de 15% maior do que quando terminado com NiTsPc. Como o pKa do EE2 é 10,4,<sup>151</sup> a hipótese de interação eletrostática com as cargas positivas das ION foi descartada, já que no pH em que as medidas foram realizadas as moléculas de EE2 permanecem protonadas. No entanto, é proposto que as moléculas de EE2, por meio dos grupos hidroxila se ancorem às ION por ligação de hidrogênio com grupos oxihidróxidos não protonados e são oxidadas conforme a seguinte reação:



**Figura 33-** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o eletrodos de (NiTsPc/ION)-10 com última camada de NiTsPc em (i) e de ION em (ii) na solução de EE2 com concentração de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 5.4.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica

Os efeitos da modificação dos eletrodos na oxidação do EE2 foram também avaliados usando espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), técnica que pode fornecer informações sobre as propriedades eletrônicas do eletrólito, da superfície do eletrodo e da região da dupla camada em sistemas eletroquímicos.<sup>152</sup> A Figura 34a mostra os espectros de EIS (gráfico de Nyquist) para os eletrodos de ITO sem filme e com os filmes (PSS/ION)-10, (PDAC/NiTsPc)-10, (NiTsPc/ION)-10 em EE2 com potencial de cela igual ao potencial de oxidação do EE2 (+0,7 V). Observa-se que somente para o eletrodo ITO(PDAC/NiTsPc)-10 o

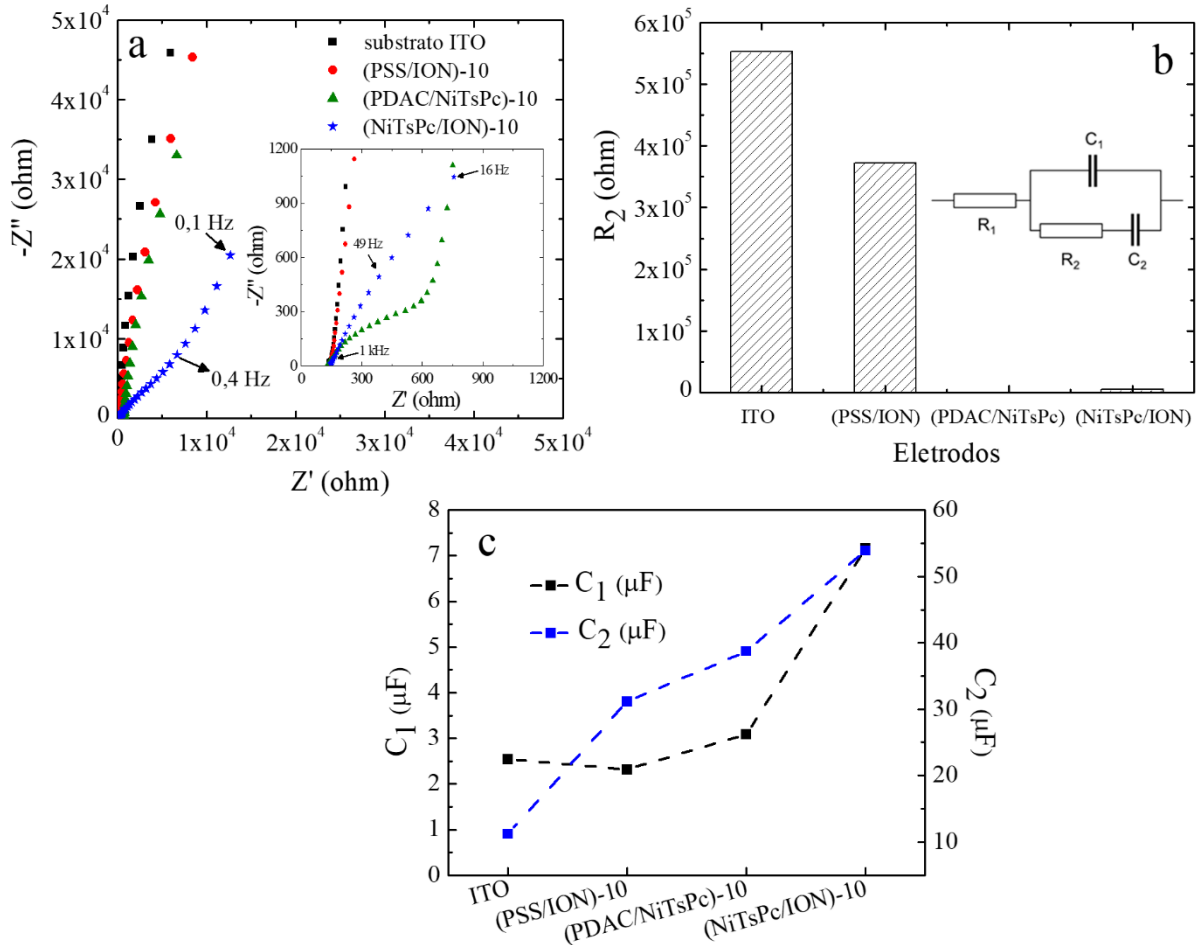
espectro mostra a região de transferência eletrônica controlada por cinética, representada pelo semicírculo em altas frequências e a região controlada por difusão, representada pela reta em baixas frequências, indicando assim que nesse eletrodo o processo de transferência eletrônica é mais lento que nos demais.<sup>74</sup>

Os dados experimentais de EIS foram ajustados com o circuito equivalente de Debye (Figura 34b), para assim se obter valores de resistência da solução ( $R_1$ ) que dependem da concentração e da condutividade do eletrólito, capacitância da dupla-camada ( $C_1$ ) que é influenciada pela concentração do eletrólito e a área de superfície do eletrodo, a resistência de transferência de carga ( $R_2$ ) e a capacitância de adsorção ( $C_2$ ) que representam a transferência de carga devido a reações faradáicas na superfície do material do eletrodo<sup>153</sup>. Para esse ajuste o erro estimado ficou entre 2,2% e 19,7%. Os valores de  $R_1$  variaram em torno de 5% com média 151  $\Omega$ , essa baixa variação era esperada já que o mesmo eletrólito (tampão acetato de sódio, pH 4,5) foi utilizado para todos os experimentos.

A Figura 34b evidencia a diminuição de  $R_2$  após a modificação do eletrodo de ITO, com valores de  $5,5 \times 10^5$  ohm (ITO);  $3,7 \times 10^5$  ohm ((PSS/ION)-10);  $5,6 \times 10^2$  ohm ((PDAC/NiTsPc)-10); e  $5,1 \times 10^3$  ohm ((NiTsPc/ION)-10), destacando-se que o  $R_2$  do ITO sem filme é aproximadamente 1000 vezes maior que para o ITO com (NiTsPc/ION)-10. O menor valor de  $R_2$  foi para o filme de (PDAC/NiTsPc)-10, provavelmente o menor valor não foi para o eletrodo (NiTsPc/ION)-10 devido como já mencionado a oxidação do EE2 nessa superfície é dependente da transferência de carga entre o ION e NiTsPc que ocorre em potencial de +0,5 V valor menor que o potencial de cela usado para os experimentos de EIS (+0,7 V). Além disso, o filme que menos diminuiu  $R_2$  foi (PSS/ION)-10, apesar das ION aumentar a área superficial do eletrodo elas tem um comportamento intermediário entre semicondutor e isolante, enquanto que metalofalocianinas são consideradas como bons semicondutores mostrando à temperatura ambiente uma mobilidade eletrônica de cerca de  $0,001 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (CuPc).<sup>154</sup>

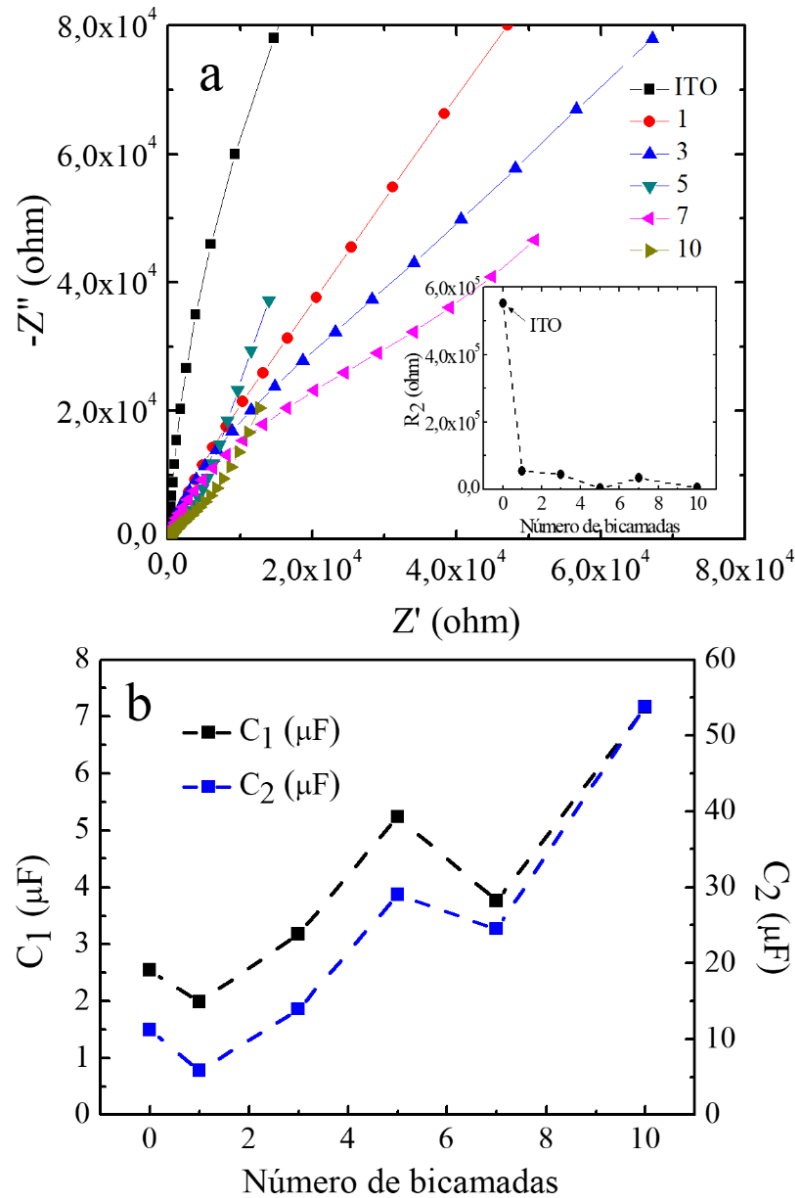
Ao contrário de  $R_2$ , os valores de  $C_1$  e  $C_2$  tendem a aumentar com a deposição de (NiTsPc/ION)-10 no ITO como mostra a Figura 34c,  $C_2$  por exemplo que representa a camada isolante formada pela adsorção de produtos da oxidação de EE2 no eletrodo é maior para o (NiTsPc/ION)-10 ( $C_2 = 53,9 \mu\text{F}$ ), do que para o ITO ( $C_2 = 11,2 \mu\text{F}$ ). O filme (NiTsPc/ION)-10 aumenta a área de superfície do eletrodo e fornece mais locais para interação com EE2 e seus subprodutos oxidados. É, portanto, demonstrado que a combinação de ION e NiTsPc no mesmo eletrodo é fundamental para a oxidação adequada de EE2.





**Figura 34-** Espectros de impedância eletroquímica para oxidação de EE2 ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) realizada com ITO, ITO(PSS/ION)-10, ITO(PDAC/NiTsPc)-10 e ITO(NiTsPc/ION)-10 com tampão acetato de sódio, pH 4,5 como eletrólito de suporte, na frequência de 100 MHz a 0,1 Hz e potencial de cela de +0,7 V, a figura inserida mostra os espectros em alta frequência. (b) Resistência de transferência de carga ( $R_2$ ), (c) capacitância da dupla-camada ( $C_1$ ) e de adsorção ( $C_2$ ) determinada para cada eletrodo através do circuito inserido na Figura 34c.

Os espectros de EIS mostrados na Figura 35a apresentam o efeito dos diferentes números de bicamadas de NiTsPc/ION na eletrooxidação do EE2. Os dados experimentais foram ajustados com o circuito da Figura 34b. O gráfico inserido mostra que  $R_2$  cai abruptamente logo após a deposição da primeira bicamada e permanece mais ou menos constante depois. Para substrato de ITO,  $R_2 = 5,5 \times 10^5$  ohm e para ITO(NiTsPc/ION)-10,  $R_2 = 5,5 \times 10^4$  ohm. O valor  $R_2$  mais baixo ( $3,3 \times 10^3$  ohm) foi alcançado com 5 bicamadas. Os resultados de capacitância apresentados na Figura 35b mostram que a partir de 1 bicamada os valores tendem a aumentar, com exceção para o filme com 7 bicamadas.



**Figura 35-** (a) Espectros de impedância eletroquímica para a oxidação de EE2 ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em eletrodos de 1 a 10 bicamadas de NiTsPc/ION com tampão acetato de sódio, pH 4,5 como eletrólito de suporte, na frequência de 100 MHz a 0,1 Hz e potencial de cela de +0,7. O gráfico inserido mostra a resistência de transferência de carga ( $R_2$ ) *versus* o número de bicamadas. (b) Capacitância da dupla-camada ( $C_1$ ) e de adsorção ( $C_2$ ) em função do número de bicamadas.

Diante dos resultados eletroquímicos discutidos até aqui, pode-se concluir que no eletrodo de ITO(NiTsPc/ION), as moléculas de NiTsPc tem o papel simultâneo de electrocatalisadoras e condutoras de cargas, enquanto que as ION são responsáveis pela ancoragem e oxidação de EE2, além disso, o complexo de transferência de carga ION-NiTsPc conduz elétrons através do filme supramolecular até atingir o substrato ITO.

Nos próximos tópicos serão apresentados os resultados da otimização do eletrodo com NiTsPc/ION e da metodologia para a quantificação de EE2.

### 5.5 Otimização do eletrodo de NiTsPc/ION

A detecção do EE2 foi avaliada para eletrodos com NiTsPc e diferentes nanopartículas de óxido de ferro denominadas np-Mgm, np-Mgn e ION na concentração de  $6,4 \text{ g L}^{-1}$ , depositados em substrato ITO e SPCE. Na Figura 36a é evidenciado que todos os eletrodos, foram capazes de oxidar o EE2, com potencial de pico anódico em aproximadamente  $+0,7 \text{ V}$ , para os eletrodos com substrato de ITO e potencial de pico em torno de  $+0,34 \text{ V}$  para o SPCE e o SPCE(NiTsPc/np-Mgn)-10, nota-se que  $J_{pa}$  quando usado SPCE é maior do que quando esse substrato é modificado com as bicamadas de NiTsPc/np-Mgn, quando esse eletrodo foi modificado com apenas uma bicamada por gotejamento e secagem dos materiais esse mesmo comportamento foi observado, diferentemente do substrato ITO que se torna mais eficiente na oxidação do EE2 após a modificação.

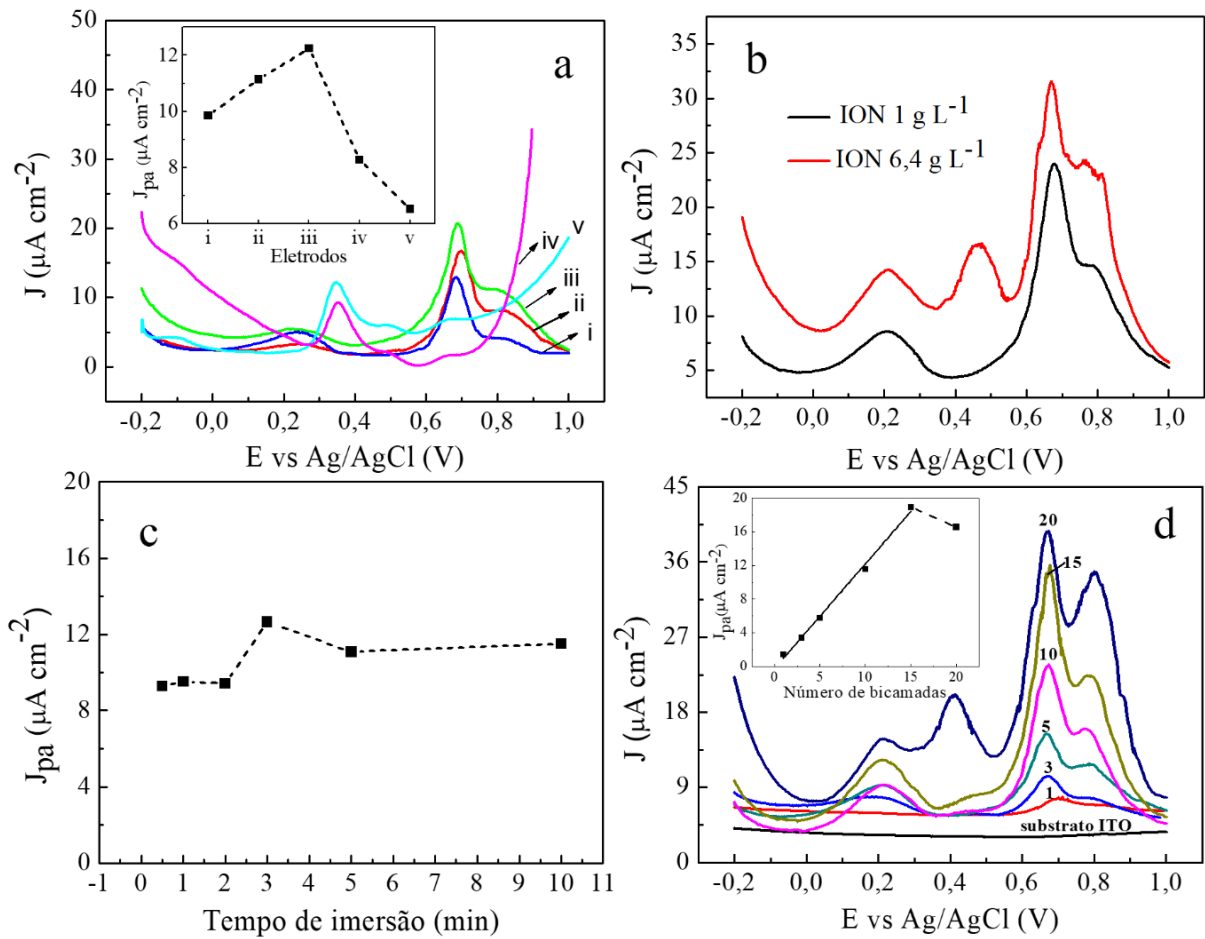
Como é apresentado no gráfico inserido na Figura 36a,  $J_{pa}$  é maior para o eletrodo de ITO(NiTsPc/np-Mgn)-10 com valor de  $12,24 \mu\text{A cm}^{-2}$ , porém, para 7 medidas consecutivas realizando condicionamento do eletrodo ( $0,6 \text{ V}$  por  $30 \text{ s}$ ) o pico de oxidação do EE2 variou  $22,65 \%$ , valor 8 vezes maior se comparado com o coeficiente de variação das medidas quando utilizado o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 que foi de  $2,85 \%$ , diante desses resultados, as ION foram escolhidas para o preparo dos eletrodos a serem usados na detecção do EE2.

Na Figura 36b pode-se comparar voltamogramas de eletrodos ITO(NiTsPc/ION)-10 preparados com dispersões de ION em diferentes concentrações, quando usado ION  $1 \text{ g L}^{-1}$  o  $J_{pa}$  para a oxidação de EE2 é  $12,87 \mu\text{A cm}^{-2}$  e para ION  $6,4 \text{ g L}^{-1}$  o  $J_{pa}$  é  $13,16 \mu\text{A cm}^{-2}$ , ou seja, uma baixa variação que não justificaria o uso de ION mais concentrada aumentando assim o custo do eletrodo.

A oxidação do EE2 em eletrodos preparados com diferentes tempos de imersão do substrato ITO na dispersão de ION e na solução de NiTsPc, também foi avaliada, como mostra a Figura 36c com 3 minutos de imersão o sinal atingiu o seu máximo, os tempos de  $30 \text{ s}$ ,  $1 \text{ min}$  e  $2 \text{ min}$  não foram suficientes para a efetiva adsorção dos materiais no ITO, refletindo assim em menores valores de  $J_{pa}$  que é dependente da quantidade de ION e NiTsPc no eletrodo como mostrado na Figura 36d, em que avaliou-se o efeito do número de bicamadas ( $n$ ) de (NiTsPc/ION) depositadas no ITO, para isso eletrodos com  $n= 1,3,5,10,15$  e  $20$  foram testados.

Neste estudo é observado que em concentração fixa de EE2, a  $J_{pa}$  aumenta até 15 bicamadas, evidenciado assim a atividade electrocatalítica desses materiais. Esse aumento de  $J_{pa}$  foi linear em função do número de bicamadas (gráfico inserido na Figura 36d), com equação  $J_{pa} = -0,25 + 1,25n$ ,  $r^2=0,994$ . Apesar do eletrodo com 15 bicamadas apresentar maior densidade de corrente optou-se pelo uso do eletrodo de 10 bicamadas que tem um tempo de preparo cerca de 30 minutos menor e, portanto um menor custo.

Diante disso, o eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 preparados com ION  $1\text{ g L}^{-1}$  e com tempo de imersão do substrato nos materiais de 3 min foi escolhido para as próximas etapas.



**Figura 36-** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com (a) ITO(NiTsPc/Mgm)-10 (i), ITO(NiTsPc/ION)-10 (ii), ITO(NiTsPc/Mgn)-10 (iii), SPCE (iv) e SPCE(NiTsPc/Mgn)-10 (v), (b) ITO(NiTsPc/ION)-10 preparados com ION  $1\text{ g L}^{-1}$  e  $6,4\text{ g L}^{-1}$ , (c) com tempos de imersão de 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min e 10 min e (d) com 1, 3, 5, 10, 15 e 20 bicamadas em EE2 na concentração de  $10\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  com tampão acetato de sódio pH 4,5 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de  $10\text{ mV s}^{-1}$ .

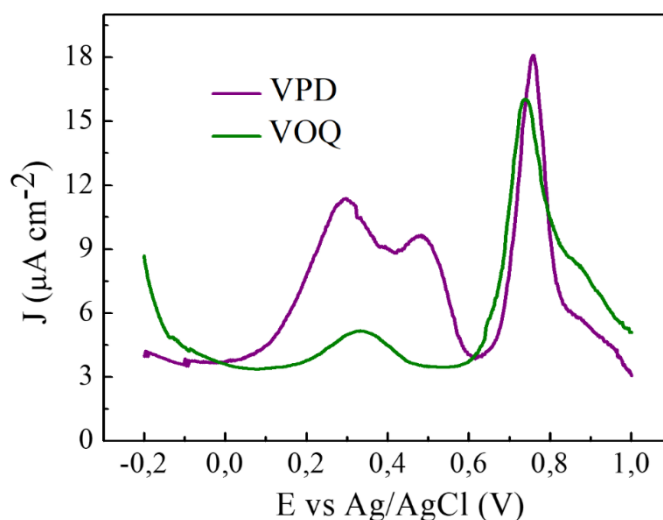
## 5.6 Otimização das condições experimentais para quantificação do EE2

### 5.6.1 Escolha da técnica eletroanalítica

As técnicas de VPD e VOQ são bastante utilizadas em aplicações analíticas, por serem mais sensíveis que outras técnicas voltamétricas, devido aos efeitos da corrente capacitiva serem minimizados ao registrar a corrente em dois momentos da aplicação do pulso.

Sendo assim, essas duas técnicas foram testadas na oxidação do EE2 na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  com o eletrodo de (NiTsPc/ION)-10, utilizando tampão acetato de sódio, pH 4 como eletrólito de suporte. Para as duas técnicas utilizou-se a mesma velocidade de varredura que foi de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e a mesma amplitude de pulso, 50 mV. Na Figura 37 observa-se que a técnica VPD foi mais sensível, apresentando um pico com maior densidade de corrente e com melhor resolução sendo portanto, escolhida para a determinação de EE2.

A VOQ é uma técnica com maior eficiência para reações com uma cinética mais rápida. No entanto, a oxidação do EE2 é um processo irreversível e mais lento.<sup>71</sup>



**Figura 37-** Comparação entre as técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ) na oxidação do EE2 na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  com o eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10, utilizando tampão acetato de sódio,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4 como eletrólito de suporte em velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de 50 mV.

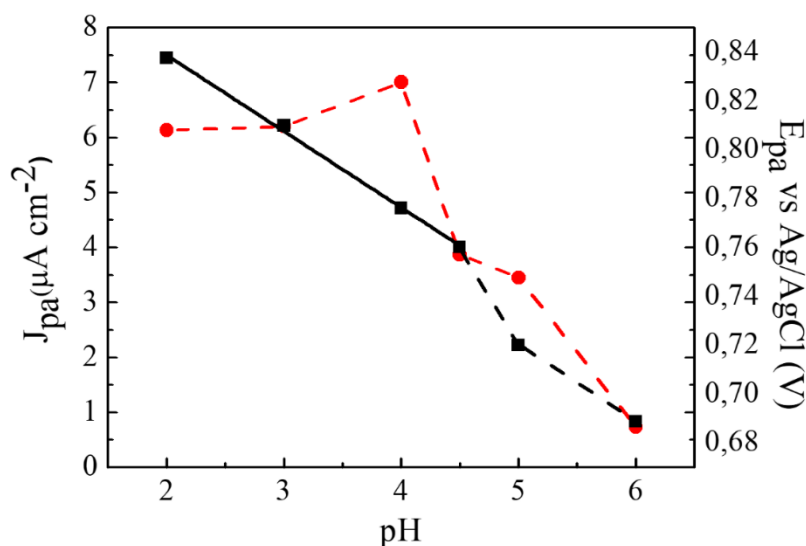
### 5.6.2 Efeito do pH na oxidação de EE2

Na Figura 38 é mostrada a influência do pH, avaliado em tampão RB  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , variando o pH no intervalo de 2,0 a 6,0. Observa-se que a densidade de corrente de pico anódico

aumenta com a diminuição do pH até 4,0, o qual foi escolhido para os experimentos subsequentes.

Outros autores observaram o sinal mais alto para oxidação do EE2 em pH 8 ou 10,<sup>19,155</sup> isso devido à medida que o pH aumenta ficando próximo ao pKa do EE2 que é 10,46,<sup>151</sup> o fenol é convertido em fenolato e a oxidação deve ser facilitada. Contudo, para o eletrodo em estudo a ION é mais estável em pH 4. Em pH < 4, os íons de Fe<sup>2+</sup> da superfície são desorvidos como aquo-complexos, enquanto que em pH básico as nanopartículas são desprotonadas e desprendem-se do filme. Portanto, em ambos os limites de pH, ocorre degradação do eletrodo e conseqüente diminuição de sensibilidade.

Ainda na Figura 38 observa-se que o potencial de pico ( $E_{pa}$ ) diminui linearmente com o pH na faixa de 2 a 4,5, indicando que a reação de oxidação do EE2 é realmente mais favorável em meio alcalino. A relação entre  $E_{pa}$  vs pH na faixa entre 2,0 e 4,5 é ajustada pela seguinte equação:  $E_{pa} = 0,901 - 0,031 \text{ pH}$  ( $r^2 = 0,997$ ).

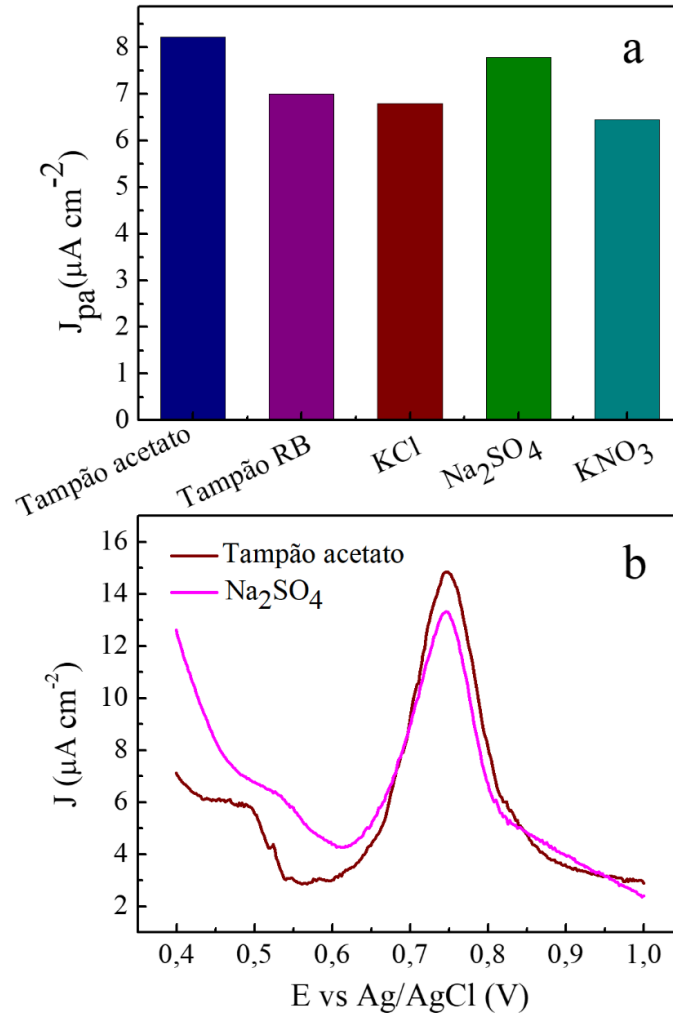


**Figura 38-** Influência do pH na densidade da corrente de pico anódico (●) e potencial de pico anódico (■) para a oxidação de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  do EE2 usando tampão RB na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como o eletrólito de suporte, adquirido com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de  $50 \text{ mV}$ .

### 5.6.3 Eletrólito de suporte e condicionamento do eletrodo

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando diferentes eletrólitos de suporte em pH 4,0, para a escolha do mais adequado. Como mostrado na Figura 39a, a melhor resposta foi obtida com o tampão de acetato de sódio e o sulfato de sódio com maiores densidades de

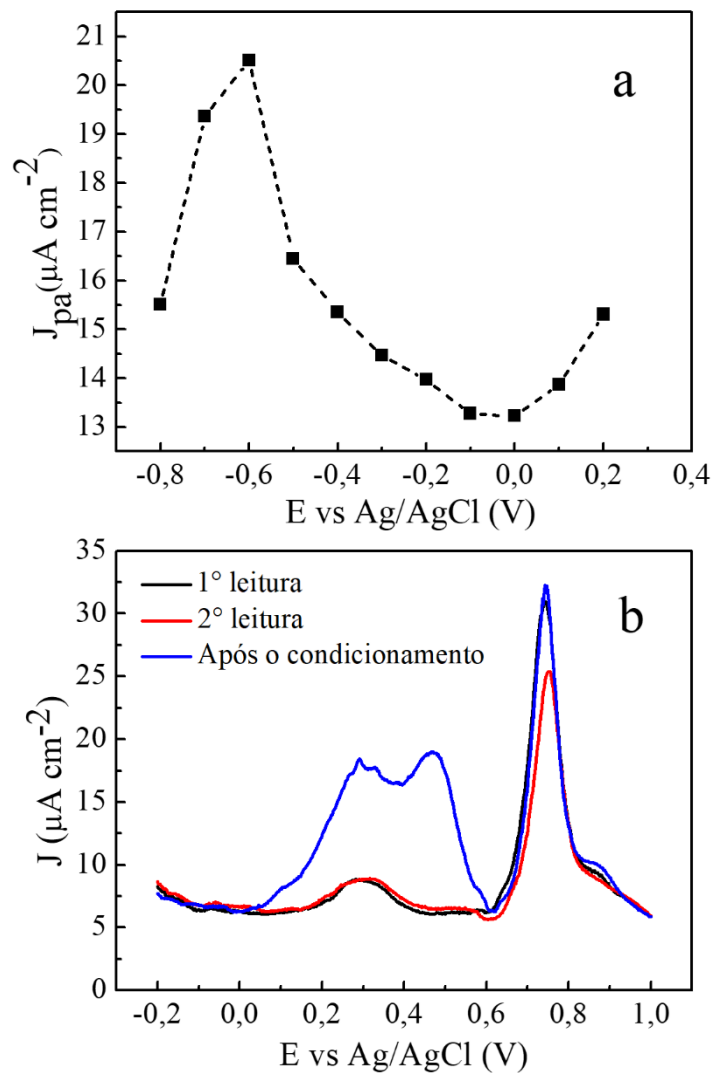
corrente de pico, porém como mostrado na Figura 39b, utilizando o acetato de sódio o pico ficou com melhor resolução e linha de base mais definida. Portanto, este foi o eletrólito de suporte selecionado para as próximas medidas de EE2.



**Figura 39-**(a) Densidade de corrente de pico anódico e (b) Voltamogramas de pulso diferencial para  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de EE2 oxidado com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em diferentes eletrólitos de suporte com amplitude de pulso 50 mV e velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

A oxidação eletroquímica do EE2 é acompanhada pela adsorção de seus produtos de oxidação; existe um envenenamento da superfície do eletrodo com diminuição dos sítios ativos disponíveis para a reação e, conseqüentemente, a diminuição do sinal analítico. Esse é um resultado típico da oxidação de moléculas orgânicas aromáticas, sendo atribuído à formação de dímeros, polímeros e quinonas, semicondutores ou isolantes. A acumulação desses produtos reduz a velocidade de transferência de elétrons na superfície do eletrodo, provocando a redução da densidade de corrente de pico.<sup>150,156</sup>

Na Figura 40a é mostrada a dependência da densidade de corrente de oxidação do EE2 em função do potencial de condicionamento do eletrodo no eletrólito, para um tempo fixo de 60 s. Observa-se que a maior densidade de corrente é obtida com o potencial de -0,6 V. Esse potencial deve ser suficiente para a redução dos coprodutos de oxidação do EE2. O efeito do condicionamento nessas condições fica mais claro no gráfico da Figura 40b. A densidade de corrente para a segunda medição, realizada sem qualquer condicionamento do eletrodo, é bem menor que a da primeira medição. Contudo, o condicionamento do eletrodo (polarização constante do eletrodo em -0,6 V por 60 s no eletrólito suporte) reestabelece a resposta obtida na primeira medição.



**Figura 40-** (a) Densidades de corrente de pico de oxidação do EE2 em função do potencial de condicionamento e (b) Voltamograma de pulso diferencial da primeira leitura, segunda leitura e após a realização do condicionamento por 60 segundos a -0,6 V do eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em EE2 na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão acetato de sódio pH 4,0, com amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$



#### 5.6.4 Velocidade de varredura e amplitude de pulso

A influência dos parâmetros de VPD sobre a oxidação do EE2 foram avaliados, como a velocidade de varredura e a amplitude de pulso. Esses parâmetros são fundamentais para a otimização do método de detecção, visando maior velocidade, sensibilidade, resolução e largura de pico. A velocidade de varredura foi verificada na faixa de 5 a 50 mV s<sup>-1</sup>.

A velocidade de varredura de 30 mV s<sup>-1</sup> apresentou maior densidade de corrente de pico de oxidação como ilustrado na Figura 41a. Além disso, nessa velocidade não houve aumento da largura a meia altura do pico ( $W_{1/2}$ ). Quanto maior a largura do pico maior será a influência na quantificação do EE2 em amostras, devido à dificuldade na separação de picos de possíveis interferentes. Nenhuma deformação do pico foi observada como mostra a Figura 41b para medidas realizadas com amplitude de pulso de 50 mV.

Na VPD, este parâmetro assume valores baixos quando comparada à VC, para que o potencial da rampa não mude significativamente durante a aplicação do pulso.<sup>157</sup> A detecção de EE2 com DPV foi relatada na literatura em velocidades de 10 mV s<sup>-1</sup> usando eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com compósito de óxido de grafeno reduzido<sup>79</sup> e 20 mV s<sup>-1</sup> com eletrodo GCE modificado com nanotubos de carbono e pontos quânticos de carbono.<sup>80</sup> Portanto, análise mais rápida é possível com o eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10.

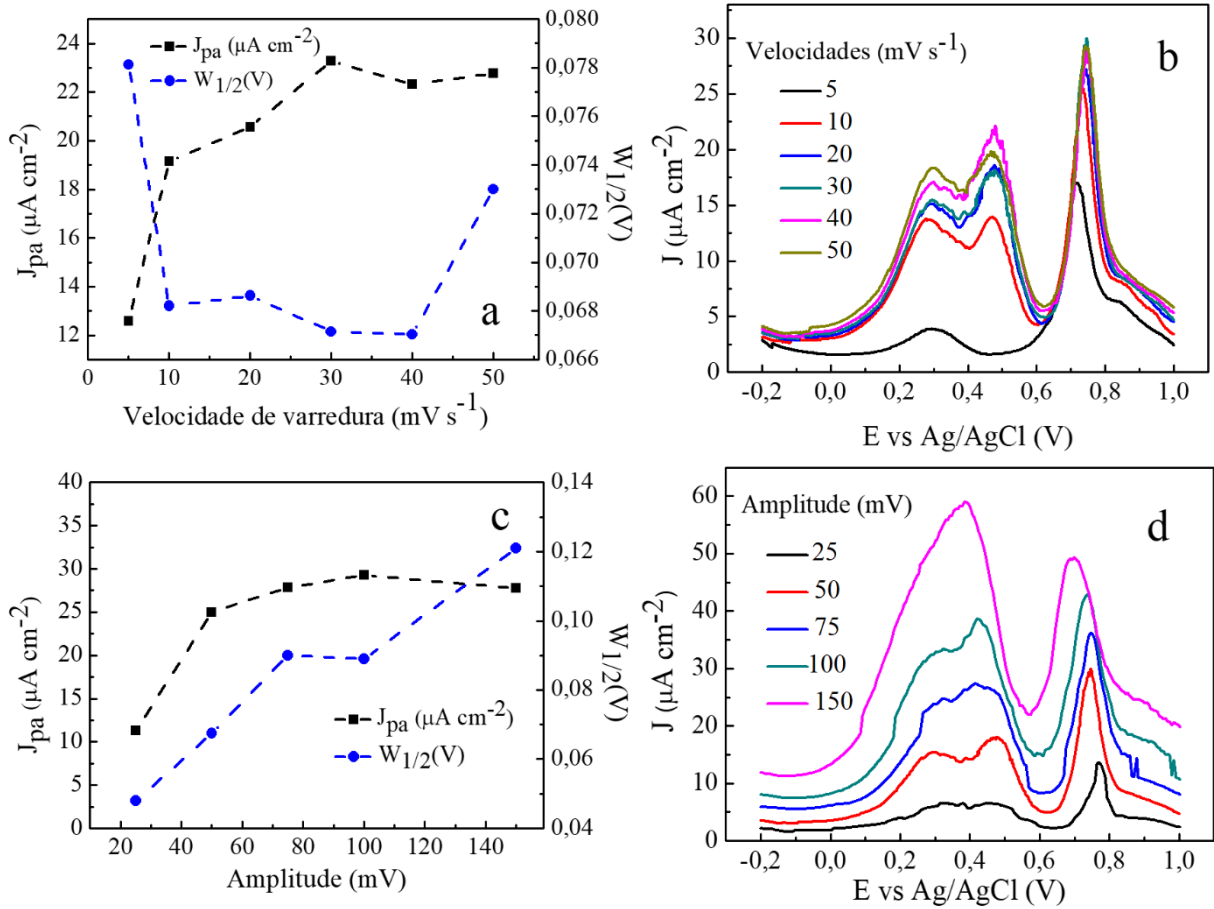
A Figura 41c mostra o efeito da amplitude do pulso que foi estudada na faixa de 25 a 150 mV com velocidade de varredura de 30 mV s<sup>-1</sup>. A densidade de corrente de pico anódico é maior para a amplitude de pulso de 100 mV, porém, ocorre um aumento considerável da largura a meia altura dos picos em amplitude de pulso superior a 25 mV.

A largura do pico a meia altura aumenta à medida que a amplitude de pulso aumenta, porque o comportamento diferencial pode ser visto através de uma maior faixa de potencial. Normalmente, não se utiliza amplitudes de pulso acima de 100 mV, pois ocorre a perda de resolução do pico como apresentado na Figura 41d.<sup>71</sup> Portanto, a amplitude de pulso escolhida foi de 50 mV, na quantificação de EE2 este é o valor geralmente utilizado.<sup>79,80,158</sup>

A amplitude de pulso ( $\Delta E$ ) também está relacionada com o potencial de pico de oxidação ( $E_p$ ) através da equação 7.

$$E_p = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (7)$$

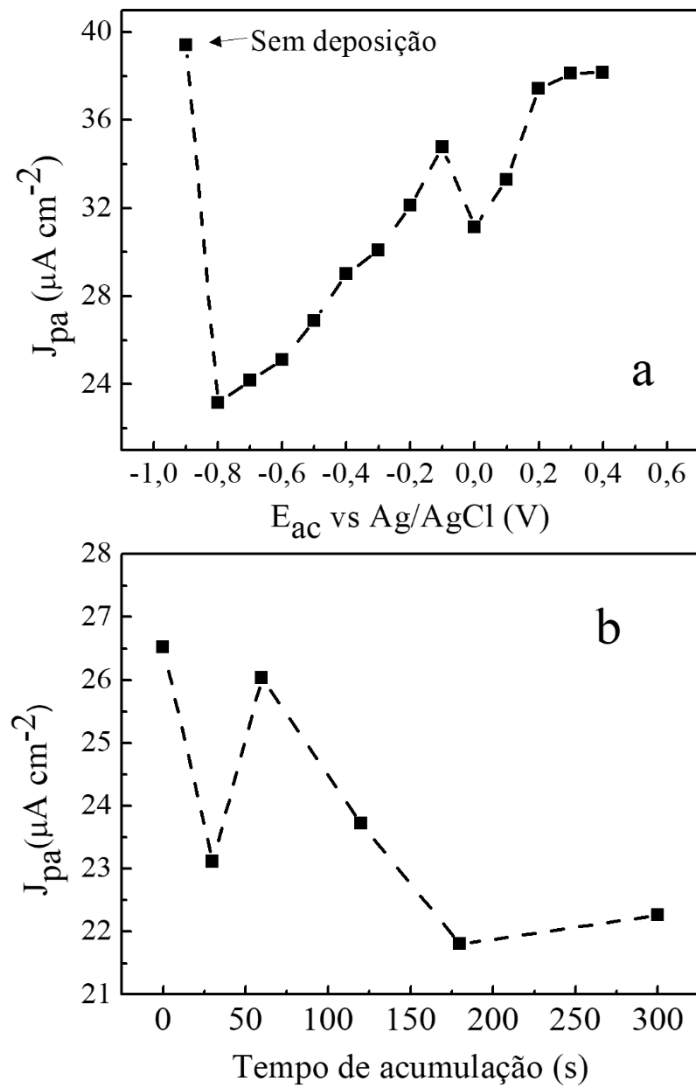
O potencial  $E_p$  se desloca para menores potenciais quando a amplitude de pulso aumenta.<sup>71</sup> Este comportamento é observado na Figura 41d.



**Figura 41-** Densidade de corrente de pico anódico e largura a meia altura do pico ( $W_{1/2}$ ) em função da (a) velocidade de varredura e (c) da amplitude de pulso. Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes (b) velocidades de varredura e (d) amplitudes de pulso obtidos com o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 em solução de EE2 na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte.

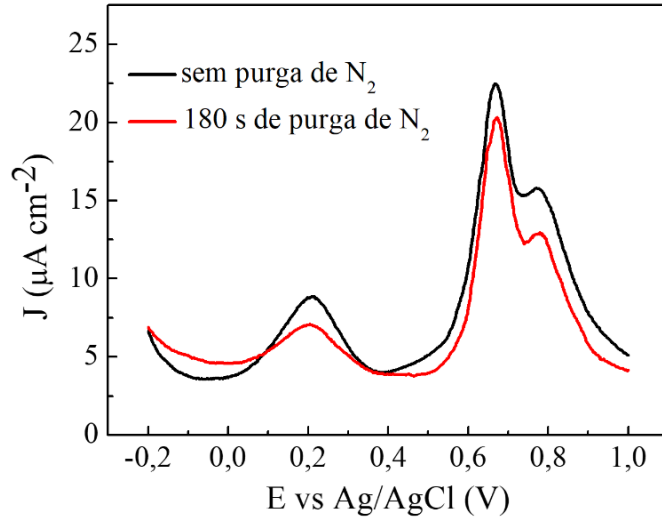
### 5.6.5 Potencial e tempo de acumulação

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método realizou-se medidas com diferentes potenciais de acumulação por 30 segundos. A Figura 42a mostra que, nos potenciais de -0,8 a +0,4 V a densidade de corrente de pico diminui em comparação à medida sem aplicação de potencial de acumulação ( $E_{ac}$ ). Com o  $E_{ac}$  de +0,3 V avaliou-se também a influência do tempo de acumulação apresentado na Figura 42b. Observa-se que mesmo com o aumento do tempo, a densidade de corrente de pico não aumentou em função da medida sem aplicação de  $E_{ac}$ .



**Figura 42-**(a) Densidade de corrente de pico anódico em função do (a) potencial de acumulação aplicado por 30 segundos (b) tempo de acumulação com potencial aplicado de 0,3 V no eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 em solução de EE2 na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de  $30 \text{ mV s}^{-1}$ .

Nas técnicas voltamétricas que se baseiam na acumulação do analito no eletrodo de trabalho, em geral é necessário que o analito adsorva na superfície do eletrodo com ou sem aplicação de  $E_{ac}$  (voltametria adsortiva) ou que o analito reduza na superfície do eletrodo para sua posterior redissolução (voltametria de redissolução anódica)<sup>70</sup>, como mostrado na Figura 43 mesmo sem aplicação  $E_{ac}$  por 180 s e homogeneização da solução com purga de nitrogênio não é observado um aumento do sinal, além disso, observa-se portanto que o oxigênio não influencia nas medidas, não sendo assim necessária essa etapa.



**Figura 43-** Voltamograma de pulso diferencial antes e após a purga com  $N_2$  por 180 segundos, registrados com eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 em solução de EE2 na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, amplitude de pulso de 50 mV e velocidade de varredura de  $30 \text{ mV s}^{-1}$ .

A Tabela 7 apresenta portanto, as condições experimentais otimizadas, que foram usadas na validação da metodologia de determinação do EE2 com o eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10.

**Tabela 7-** Parâmetros experimentais de voltametria de pulso diferencial.

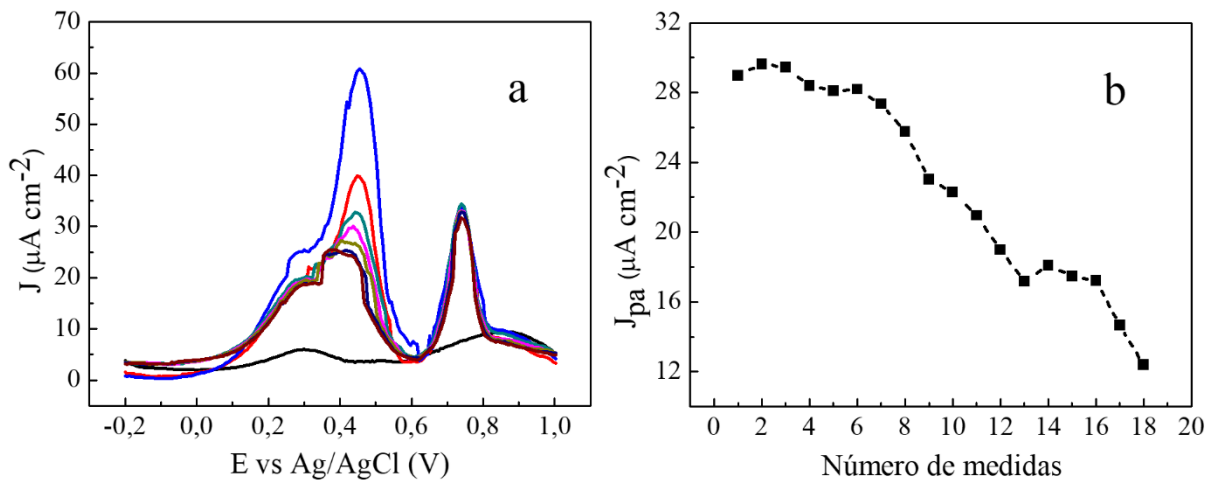
Parâmetros	Condições experimentais
Potencial inicial de varredura	-0,2 V
Eletrólito de suporte	Tampão acetato de sódio, pH 4,0 e sem purga de $N_2$
Condicionamento do eletrodo	-0,6 V por 30 segundos
Velocidade de varredura	$30 \text{ mV s}^{-1}$
Amplitude de pulso	50 mV

### 5.7 Validação da metodologia

A validação da metodologia proposta, realizada de acordo com o documento de orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO<sup>112</sup> é apresentada neste tópico. A repetibilidade das medidas foi estimada através da realização de experimentos de VPD com oxidação de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de EE2 no eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10, usando os parâmetros voltamétricos otimizados e descritos anteriormente. A Figura 44a fornece os voltamogramas

para sete medidas consecutivas, o coeficiente de variação foi de 2,85%, valor aceitável de acordo com a AOAC (sigla do inglês Association of Official Analytical Chemists) que determina um valor máximo de coeficiente de variação de 11% para a concentração estudada.<sup>113</sup> Na Figura 44b, verifica-se que a densidade da corrente de pico de oxidação diminuiu com o número de medidas, até onze medidas com um eletrodo são possíveis obtendo um coeficiente de variação aceitável, mostrando ser um método preciso.

A precisão intermediária foi avaliada com três eletrodos de (NiTsPc/ION)-10 fabricados da mesma maneira e no mesmo dia, com coeficiente de variação de 6,99% para a densidade de pico de oxidação de EE2. Esse valor aumentou para 9,04% quando o sinal analítico de três eletrodos de (NiTsPc/ION)-10 fabricados em dias diferentes foram comparados.

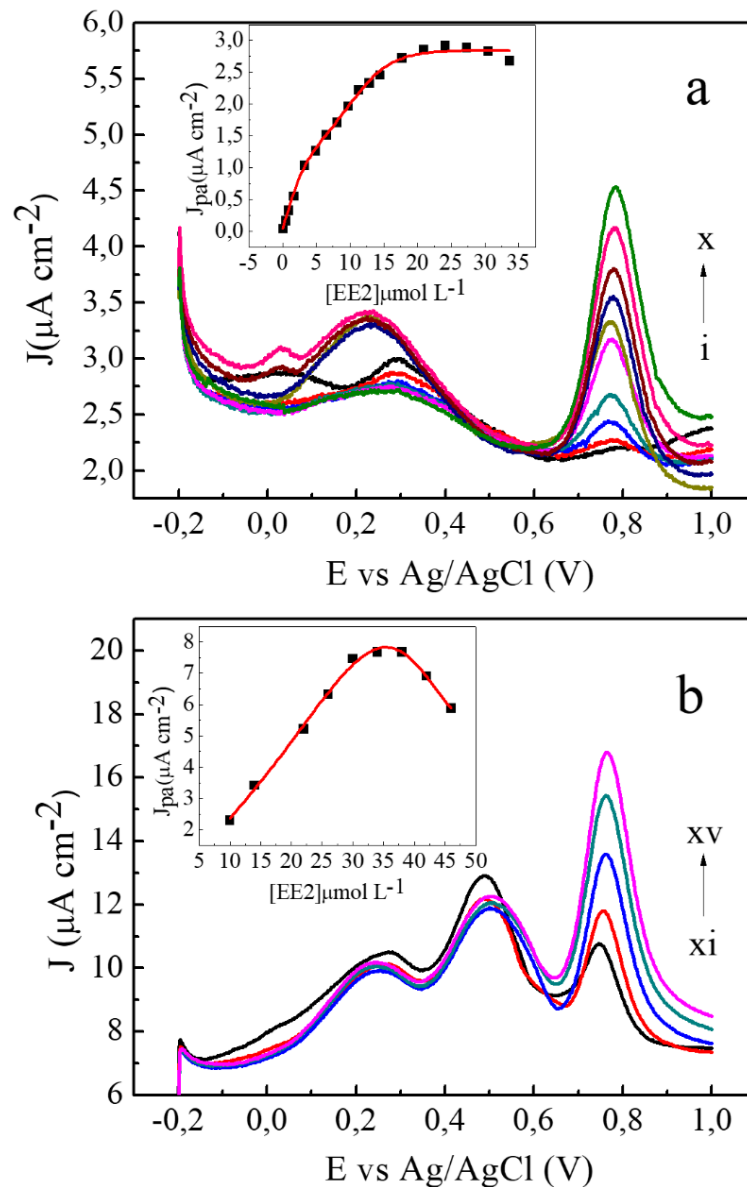


**Figura 44-** (a) Voltamograma de pulso diferencial de 7 medidas consecutivas EE2 na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  adquirido com o eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, velocidade de varredura de  $30 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de 50 mV, (b) Densidade de corrente de pico anódico em função do número de medidas.

A faixa linear de trabalho na quantificação de EE2 com o eletrodo de (NiTsPc/ION)-10 foi investigada realizando-se VPD na faixa de concentração de  $0,07$  a  $33,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A resposta analítica mostrada no gráfico inserido na Figura 45a foi linear na faixa de  $0,07$  a  $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  com equação de regressão linear  $J_{pa} = 0,024 + 0,308 [\text{EE2}]$  e  $r^2 = 0,998$ . Outra região linear também foi observada, na faixa de  $3,3$  a  $11,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  com equação  $J_{pa} = 0,543 + 0,147 [\text{EE2}]$ ,  $r^2 = 0,998$ . Os voltamogramas da Figura 45 são referentes as concentrações de EE2 das regiões lineares.

Portanto, fica evidente que o aumento da concentração de EE2 e o número de medidas realizadas provoca a degradação parcial do eletrodo, em que algumas ION são erodidas durante

as varreduras de potencial sucessivas e a área eletroativa do eletrodo é diminuída, caindo a inclinação da reta e significando assim a diminuição da sensibilidade do eletrodo nessas condições. A Figura 45b mostra os resultados de VPD para maiores concentrações de EE2, destinados a observar a região de saturação, um novo eletrodo de ITO(NiTSPc/ION)-10 foi usado na faixa de concentração de 10 a 46  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , um intervalo linear de 10 a 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com equação  $J_{pa} = -0,21 + 0,25 [EE2]$  e  $r^2 = 0,997$  é observado no gráfico inserido na Figura 45b.



**Figura 45-** (a) Voltamograma de pulso diferencial do EE2 nas concentrações de (i) 0,07; (ii) 0,5; (iii) 0,9; (iv) 1,7; (v) 3,3; (vi) 4,9; (vii) 6,5; (viii) 8,1; (ix) 9,7; (x) 11,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (b) nas concentrações de (xi) 10; (xii) 14; (xiii) 22; (xiv) 26; (xv) 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  adquiridos com eletrodo de ITO(NiTSPc/ION)-10 usando tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte, velocidade de varredura de 30  $\text{mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de 50 mV.

Para concentrações de EE2 superiores a 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a densidade de corrente de pico aumenta de forma não linear, atingindo um valor constante, o que sugere a saturação do processo de adsorção de EE2 na superfície do eletrodo<sup>20,155</sup>, embora seja realizado o condicionamento do eletrodo o sinal diminui após a concentração de 38  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Portanto, a linearidade é observada na faixa de concentração de 0,07 a 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) obtidos a partir das razões  $3S_b/b$  e  $10S_b/b$ , respectivamente, em que  $S_b$  é o desvio padrão de 7 medidas do branco e  $b$  é a inclinação da curva analítica<sup>90</sup> foram  $LD = 7,8 \times 10^{-9}$  e  $LQ = 2,4 \times 10^{-8}$  mol  $L^{-1}$ .

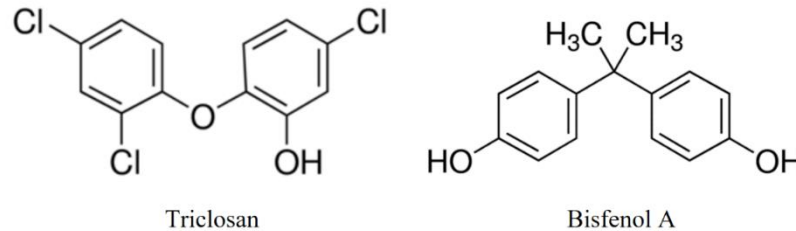
Tanto a faixa linear de trabalho quanto o LD obtidos com o eletrodo (NiTsPc/ION)-10 são comparáveis àqueles exibidos por outros eletrodos relatados na Tabela 8. No entanto, vale a pena mencionar que a maioria dos eletrodos relatados são compostos por materiais mais caros e, em muitos casos, não mostram o mesmo desempenho para várias medidas que o eletrodo ITO(NiTsPc/ION)-10 apresenta. A Tabela 8 também relata o tempo de preparo dos eletrodos, quando disponíveis.

**Tabela 8-** Comparação de limites de detecção e faixa linear de trabalho de diferentes eletrodos modificados para a quantificação de EE2.

Eletrodo e tempo de preparo	Técnica	LD (mol $L^{-1}$ )	Faixa linear (mol $L^{-1}$ )
GCE/rGO/RuO <sub>2</sub> <sup>79</sup>	VPD	$2,0 \times 10^{-9}$	$5,5 \times 10^{-8}$ a $1,2 \times 10^{-6}$
HRP-EE2-anti-E2/AgNPs/ SiO <sub>2</sub> /GO/GCE <sup>159</sup> ; uma noite	Amp	$2,2 \times 10^{-10}$	$3,4 \times 10^{-10}$ a $1,7 \times 10^{-7}$
HMDE <sup>160</sup>	VPD	$1,6 \times 10^{-9}$	$6,7 \times 10^{-9}$ a $3,3 \times 10^{-7}$
MWCNTs/GCE/MPs/anti-EE2 <sup>157</sup>	VOQ	$3,4 \times 10^{-14}$	$1,2 \times 10^{-13}$ a $2,4 \times 10^{-10}$
CPB/CPE <sup>155</sup>	LSV	$3,0 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-5}$
Chi/CNTs <sup>20</sup> ; 0,65 h	VOQ	$9,0 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-5}$
BDD <sup>161</sup>	VOQ	$2,4 \times 10^{-7}$	$7,9 \times 10^{-7}$ a $5,2 \times 10^{-6}$
PVP/Chi/rGO_Lac <sup>162</sup>	Amp	$1,5 \times 10^{-13}$	$2,5 \times 10^{-13}$ a $2,0 \times 10^{-11}$
GCE/SWCNT/C-dot/Lac <sup>80</sup>	VPD	$4,0 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-8}$ a $7,0 \times 10^{-6}$
AgNP-SAE-CTAB <sup>163</sup>	SCV	$1,03 \times 10^{-7}$	$6,4 \times 10^{-7}$ a $7,8 \times 10^{-6}$
GCE/MWCNT/CoPc <sup>110</sup> ; 2,2 h	VOQ	$2,2 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$ a $9 \times 10^{-5}$
Pd/g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -CNTs/GCE <sup>164</sup>	VPD	$5,00 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4}$
Au/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TA/MWNT/GCE <sup>165</sup>	VPD	$3,3 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-8}$ a $1,2 \times 10^{-4}$
<b>Este trabalho; 1 h</b>	<b>VPD</b>	<b><math>7,8 \times 10^{-9}</math></b>	<b><math>7 \times 10^{-8}</math> a <math>3 \times 10^{-5}</math></b>

### 5.7.1 Estudos de interferência e aplicação analítica

A interferência de alguns compostos orgânicos na oxidação do EE2 foi avaliada com o sinal analítico sendo observado na presença de três tipos de estrogênios estruturalmente semelhantes, como E1, E2 e E3 (ver Figura 1), além de triclosan e bisfenol A que tem suas estruturas ilustradas na Figura 46. As medidas eletroquímicas foram adquiridas com o eletrodo de (NiTsPc/ION)-10 em soluções de EE2 e interferente na concentração fixa de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando os parâmetros otimizados. Todos os compostos interferiram aumentando a densidade de corrente de pico de oxidação de EE2 cerca de 68% na presença de triclosan e 94% na presença de bisfenol A. Para os estrogênios avaliados o aumento do sinal foi de 113% na presença de estrona, 60% para estriol e 129% para estradiol, esses estrôgenios apresentam mesmo mecanismo e potencial de oxidação, portanto para a detecção especificamente de EE2 é necessário uma etapa prévia de extração desse hormônio na amostra. Apesar dessa desvantagem, os eletrodos propostos poderiam ser usados para detectar a concentração estrogênica total, que é na verdade mais importante do que simplesmente detectar um único estrogênio.

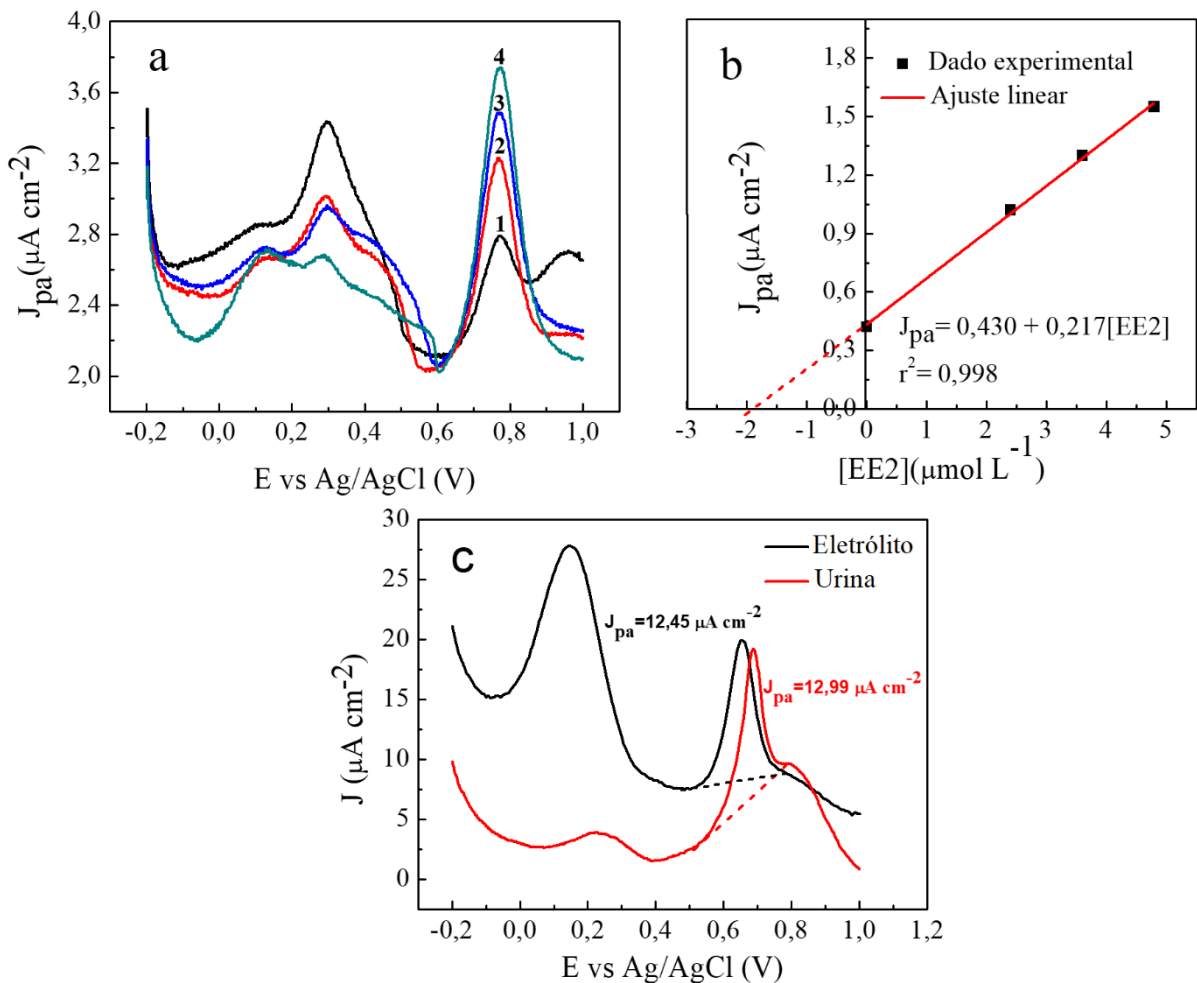


**Figura 46-** Estruturas químicas do triclosan e bisfenol A

No entanto, o método não apresentou interferência para amostras de água de torneira e amostras coletadas na estação de tratamento do Lago Paranoá que sem pré-tratamento foram analisadas com a adição de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de EE2 para determinar a recuperação. Os resultados foram obtidos utilizando o método de adição de padrão. A Figura 47a apresenta os voltamogramas da amostra após a adição de diferentes concentrações de EE2 e a Figura 47b mostra a curva analítica. O valor da concentração é determinado pela extrapolação da curva analítica até o ponto de intersecção com o eixo das concentrações, calculado pela equação de regressão linear da curva (inserida na Figura 47b). Como mostra a Tabela 9 a recuperação foi entre 96,2% e 109,6% estando portanto, de acordo com a AOAC que estabelece uma recuperação entre 80% e 110% para a faixa de concentração avaliada neste trabalho<sup>113</sup>. Nas amostras sem adição de padrão não foi detectada a presença de EE2.



Outra aplicação possível para o método desenvolvido é em amostras de urina, na Figura 47c é apresentado os voltamogramas de pulso diferencial adquiridos para EE2 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em urina sintética e no eletrólito de suporte (tampão acetato de sódio, pH 4,0). Observa-se que, na urina sintética, o voltamograma é deslocado para cima devido à maior força iônica do meio, enquanto o  $E_{\text{pa}}$  é ligeiramente deslocado para um potencial mais baixo e o  $J_{\text{pa}}$  é reduzido menos de 5%. Além disso, a oxidação da magnetita em maguemita ocorre com potencial mais baixo, mas com corrente muito mais alta, o que foi atribuído à formação de  $\text{FePO}_4$  solúvel.



**Figura 47-** (a) Voltamograma de pulso diferencial da amostra coletada na estação de tratamento do Lago Paranoá com adição de EE2 nas concentrações de (1)  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (2)  $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (3)  $3,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (4)  $4,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $J_{\text{pa}}$  versus concentração de EE2 adicionada. (c) Voltamograma de pulso diferencial para EE2 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão acetato de sódio pH 4,0 como eletrólito de suporte e urina sintética, registrados com eletrodo de ITO(NiTSPc/ION)-10, velocidade de varredura de  $30 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de  $50 \text{ mV}$ . A linha tracejada representa a linha de base utilizada para determinar  $J_{\text{pa}}$

**Tabela 9-**Teste de recuperação de EE2 em amostras de água.

Amostra	EE2 ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado $\pm$ DP*	
Água da torneira	2	2,13 $\pm$ 0,23	106,5
	10	10,96 $\pm$ 0,91	109,6
Água da estação de tratamento do Lago Paranoá	2	1,92 $\pm$ 0,22	96,2
	10	10,2 $\pm$ 0,42	102

\*Desvio Padrão de 3 alíquotas diferentes.

Com o método proposto foi realizado também uma tentativa da quantificação de EE2 em comprimidos anticoncepcionais, porém esses fármacos geralmente tem a presença de outros hormônios com concentração bem maior que do EE2 que interferiram na medida, reforçando portanto a ideia de aplicação desse eletrodo para quantificação de estrogênios totais.

## 6. CONCLUSÕES

A caracterização das nanopartículas de óxido de ferro (ION) através de microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-x e potencial zeta demonstrou que elas são uma mistura de maguemita e magnetita aproximadamente esféricas e carregadas positivamente, sendo possível assim o crescimento do filme por LbL com ftalocianina de níquel(II) tetrassulfonada (NiTsPc).

A deposição dos nanomateriais no substrato ITO foi assegurada por meio de espectroscopia de UV-vis, onde observou-se que a quantidade adsorvida de nanomateriais aumentou linearmente com o número de tetracamadas, permitindo assim um grande controle do processo de fabricação do eletrodo. A disposição também foi confirmada com espectroscopia Raman, ambas as técnicas demonstraram que a interação entre ION e NiTsPc é eletrostática e covalente formada por pontes Fe(III)-O-Ni(II). Além disso, a modificação ficou evidente com as imagens de microscopia eletrônica de varredura, espectros de raios X, dispersão de energia e microscopia de força atômica.

Eletrodos de ITO modificados com ION e NiTsPc em separado apresentam desempenho muito inferior na oxidação do EE2, mostrando, portanto, a ocorrência de um efeito sinérgico entre ION e NiTsPc, a eficiência desse processo de oxidação é dependente da transferência de carga entre ION e NiTsPc, facilitada pelas pontes Fe(III)-O-Ni(II). O eletrodo apresentou melhor resposta voltamétrica nas medidas de EE2 após a realização de condicionamento entre as leituras, devido ao processo de oxidação desse analito formar produtos que adsorvem no eletrodo. Os parâmetros de VPD mais adequados e sensíveis para a quantificação de EE2 foram tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito de suporte, potencial inicial de varredura de  $-0,2 \text{ V}$  velocidade de varredura de  $30 \text{ mV s}^{-1}$  e amplitude de pulso de  $50 \text{ mV}$ .

O coeficiente de variação para 7 medidas consecutivas foi de 2,85%, apesar desse coeficiente aumentar para 11% quando utilizado eletrodos preparados em dias diferentes, o método não é comprometido devido as leituras serem realizadas com um mesmo eletrodo para cada alíquota e a quantificação ser feita com adição de padrão. Além disso, o método apresentou valores de faixa linear de trabalho e limite de detecção comparáveis a outros relatados anteriormente na literatura, porém, com valores acima da quantidade de EE2 geralmente encontrada na água. O método exibiu interferência de outros estrogênios, evidenciando que pode ser aplicado para quantificação de estrogênios. Apesar disso, as medidas não foram afetadas pela composição de matrizes como água de lago e urina sintética.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para trabalhos futuros, sugere-se o foco na melhoria da sensibilidade e especificidade do eletrodo de ITO(NiTsPc/ION)-10 para a detecção de EE2 ou otimização da metodologia para aplicação na quantificação de hormônios totais. As seguintes estratégias podem ser adotadas:

- Adição de uma espécie estável como a ciclodextrina na arquitetura do filme de NiTsPc/ION escolhida, para melhorar a especificidade e sensibilidade para o EE2.
- Realização de testes com outras técnicas eletroquímicas como a amperometria e a impedância para a detecção de EE2, otimizando os parâmetros experimentais e realizando a validação da metodologia com determinação dos parâmetros descritos em guias nacionais e internacionais.
- Avaliação da performance do eletrodo na quantificação de hormônios totais, realizando curva analítica para uma mistura de diferentes hormônios.
- Avaliar o efeito de matriz comparando curvas analíticas realizadas no eletrólito de suporte e na presença da amostra.
- Aplicação do método na análise de amostras de água coletadas diferentes estações de tratamento do Distrito Federal.
- Validação da metodologia também para análise de amostras de urina humana.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sosa-Ferrera, Z. ; Mahugo-Santana, C. ; Santana-Rodríguez, J. J. ; *BioMed Res. Int.* **2013**, 2013, 674838.
2. Lima, D. R. S.; Baêta, B. E. L.; Aquino, S. F.; Libânio, M.; Afonso, R. J. C. F. ; *Water, Air, Soil Pollut.* **2014**, 225, 2170.
3. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/30004ZD3.PDF?Dockey=30004ZD3.PDF>, acessado em Agosto de 2020.
4. Bila, D. M.; Dezotti, M. ; *Quim. Nova* **2007**, 30, 651.
5. Rodprasert, W.; Main, K. M.; Toppari, J.; Virtanen, H. E. ; *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res.* **2019**, 7, 49.
6. Lamartiniere, C. A.; Jenkins, S.; Betancourt, A. M.; Wang, J.; Lamartiniere, C. A.; Russo, J.; Lamartiniere, C. A. ; *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2011**, 5, 45.
7. Ho, S. M.; Tang, W. Y.; Belmonte De Frausto, J.; Prins, G. S. ; *Cancer Res.* **2006**, 66, 5624.
8. Smarr, M. M.; Kannan, K.; Buck Louis, G. M. ; *Fertil. Steril.* **2016**, 106, 959.
9. Rattan, S.; Zhou, C.; Chiang, C.; Mahalingam, S.; Brehm, E.; Flaws, J. A. ; *J. Endocrinol* **2015**, 233, R109.
10. Miller, M. D.; Crofton, K. M.; Rice, D. C.; Zoeller, R. T. ; *Environ. Health Perspect.* **2009**, 117, 1033.
11. Weiss, B. ; *Neurotoxicology* **2012**, 33, 1410.
12. Solomon, G. M.; Schettler, T. ; *CMAJ* **2000**, 163, 1471.
13. [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/sct/documents/out37\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sct/documents/out37_en.pdf), acessado em Agosto de 2020.
14. Scala-Benuzzi, M. L.; Raba, J.; Soler-Illia, G. J. A. A.; Schneider, R. J.; Messina, G. A. ; *Anal. Chem.* **2018**, 90, 4104.
15. Lima, D. R.S.; Tonucci, M. C.; Libânio, M.; Aquino, S. F.; *Eng. Sanit. Ambient.* **2017**, 22, 1043.
16. Sodré, F. F.; Pescara, I. C.; Montagner, C. C.; Jardim, W. F. ; *Microchem. J.* **2010**, 96, 92.
17. Shareef, A.; Parnis, C. J.; Angove, M. J.; Wells, J. D.; Johnson, B. B. ; *J. Chromatogr. A* **2004**, 1026, 295.
18. Hordge, L. N.; Mcdaniel, K. L.; Jones, D. D.; Fakayode, S. O.; *Talanta* **2016**, 15, 401.

19. Smajdor, J.; Piech, R.; Piek, M.; Paczosa-Bator, B. ; *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164*, 885.
20. Pavinatto, A.; Mercante, L. A.; Leandro, C. S.; Mattoso, L. H. C.; Correa, D. S. ; *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *755*, 215.
21. Arvand, M.; Hemmati, S. ; *Talanta* **2017**, *174*, 243.
22. Yadav, S. K.; Chandra, P.; Goyal, R. N.; Shim, Y. ; *Anal. Chim. Acta* **2013**, *762*, 14.
23. Lee, J.; Morita, M.; Takemura, K.; Park, E. Y. ; *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 425.
24. Pavinatto, A.; Mercante, L. A.; Leandro, C. S.; Mattoso, L. H. C.; Correa, D. S. ; *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *755*, 215.
25. Ribeiro, C. de L.; Santos, J. G. M.; Souza, J. R.; Paterno, L. G. ; *J. Solid State Electrochem.* **2019**, *23*, 783.
26. Sun, B.; Gou, Y.; Ma, Y.; Zheng, X.; Bai, R.; Attia, A.; Abdelmoaty, A.; Hu, F. ; *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *88*, 55.
27. Zheng, Q.; Yu, Y.; Fan, K.; Ji, F.; Wu, J.; Ying, Y. ; *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 5819.
28. Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J. P.; Giudice, L. C.; Hauser, R.; Prins, G. S.; Soto, A. M.; Zoeller, R. T.; Gore, A. C. ; *Endocr. Rev.* **2009**, *30*, 293.
29. [http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/committees/envi/20000418/123706\\_pt.pdf](http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/committees/envi/20000418/123706_pt.pdf), acessado em Agosto de 2020.
30. Luo, Y.; Guo, W.; Ngo, H. H.; Nghiem, L. D.; Hai, F. I.; Zhang, J.; Liang, S.; Wang, X. C. ; *Sci. Total Environ.* **2014**, *473–474*, 619.
31. Pinho, E. A. da S.; Ferreira, L. F. R.; Américo-Pinheiro, J. H. P.; Torres, N. H. *Bioenergia em Revista: Diálogos*; Fatec: Piracicaba, 2017.
32. Dodds, E. C.; Lawson, W. ; *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **1938**, *125*, 222.
33. Burlington, H.; Lindeman, V. F. ; *Exp. Biol. Med.* **1950**, *74*, 48.
34. Giusti, R. M. ; *Ann. Intern. Med.* **1995**, *122*, 778.
35. Bottoni, P.; Caroli, S.; Caracciolo, A. B. ; *Toxicol. Environ. Chem.* **2010**, *92*, 549.
36. Melo, S. A. S.; Trovó, A. G.; Bautitz, I. R.; Nogueira, R. F. P. ; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 188.
37. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html), acessado em Setembro de 2020.
38. Umbuzeiro, G. de A. ; *Guia de potabilidade para substâncias químicas, São Paulo: Limiar* **2012**, 144.
39. Cunha, D. L. da; Silva, S. M. C. da; Bila, D. M.; Oliveira, J. L. da M.; Sarcinelli, P. de

- N.; Larentis, A. L. ; *Cad. Saude Publica* **2016**, 32, e00056715.
40. <https://www.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-3-ccl-3>, acessado em Setembro de 2020.
41. <https://circabc.europa.eu/sd/a/efb00adc-ece7-4bec-a611-3b612cf1f942/EE2%20EQS%20dossier%202011.pdf> acessado em Setembro de 2020.
42. Gilbert, N. ; *Nature* **2012**, 491, 503.
43. Ganesh, V.; Pal, S. K.; Kumar, S.; Lakshminarayanan, V. ; *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 296, 195.
44. Kleemann, A.; *Pharmaceutical substances: syntheses, patents and applications*; 3 ed.; Thieme:New York, 1999.
45. Inhoffen, H. H.; Logemann, W.; Hohlweg, W.; Serini, A.; *Naturwissen-schaften* **1938**, 26, 96.
46. Cagnacci, A. ; *Eur. J. Contracept. Reprod. Heal. Care* **2017**, 22, 191.
47. [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42061/WHO\\_TRS\\_877.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42061/WHO_TRS_877.pdf?sequence=1&isAllowed=y), acessado em Setembro de 2020.
48. Raps, M.; Curvers, J.; Helmerhorst, P. F. M.; Ballieux, B. E. P. B.; Rosing, P. J.; Thomassen, S. ; *Thromb. Res.* **2014**, 133, 640.
49. Wenzel, A., Müller, J., Ternes, T.; *Study on endocrine disrupters in drinking water*. Final Report ENV.D.1/ETU/2000/0083. Schmalleberg and Wiesbaden, Germany, 2003.
50. Adeel, M.; Song, X.; Wang, Y.; Francis, D.; Yang, Y. ; *Environ. Int.* **2017**, 99, 107.
51. Daniel, M. S.; Lima, E. C.; *Rev. Ambient. Água* **2014**, 9, 689.
52. Bhandari, R. K.; Vom Saal, F. S.; Tillitt, D. E. ; *Sci. Rep.* **2015**, 5, 9303.
53. Johnson, A. C.; Williams, R. J. ;*Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 3649.
54. Moreira, D. S.; Aquino, S. F.; Afonso, R. J.C.F, Santos, E. P.P.C; Pádua, V. L. *Environmental Technology* **2009**, 30, 1041.
55. Sodré, F. F.; Montagner, C. C.; Locatelli, M. A. F.; Jardim, W. F.; *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* **2007**, 2, 187.
56. Torres, N. H.; Aguiar, M. M.; Fernando, L.; Ferreira, R.; Heloisa, J.; Américo, P.; Machado, Â. M.; Cavalcanti, E. B.; Tornisielo, V. L. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, 187, 379.
57. Helena, L.; Coelho, G.; Jesus, T. A. De; Kohatsu, M. Y.; Poccia, G. T.; Chicarolli, V.; Helwig, K.; Hunter, C.; Roberts, J.; Teedon, P.; Pahl, O. *Water Air Soil Pollut*, **2020**, 231, 150.

58. Machado, K. S.; Cardoso, F. D.; Cesar, J.; Azevedo, R.; Braga, C. B. *Acta Scientiarum* **2014**, *36*, 421.
59. Machado, K. C.; Grassi, M. T.; Vidal, C.; Pescara, I. C.; Jardim, W. F.; Fernandes, A. N.; Sodré, F. F.; Almeida, F. V.; Santana, J. S.; Canela, M. C.; Nunes, C. R. O.; Bichinho, K. M.; Severo, F. J. R. ; *Sci. Total Environ.* **2016**, *572*, 138.
60. Sampaio, T. R.; Sodré, F. F. *Emerging Contaminants* **2020**, *6*, 72.
61. Zaharin, A.; Soraya, A.; Mangala, S. ; *Environ. Int.* **2014**, *69*, 104.
62. Bhandari, R. K.; Deem, S. L.; Holliday, D. K.; Jandegian, C. M.; Kassotis, C. D.; Nagel, S. C.; Tillitt, D. E.; Frederick, S.; Rosenfeld, C. S. ; *Gen. Comp. Endocrinol.* **2015**, *214*, 195.
63. Li, J.; Zou, M.; Liu, X.; Yun, C. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 1004.
64. Monteleone, P.; Luisi, M.; Colurcio, B.; Casarosa, E.; Monteleone, P.; Ioime, R.; Genazzani, A. R.; Maj, M. ; *Psychosom. Med.* **2001**, *63*, 62.
65. Hochberg, Z.; Makler, A.; Ohana, N.; Chayen, R.; Munichor, N. M.; Hiort, O.; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, *81*, 2821.
66. Zou, Y.; Li, Y.; Jin, H.; Tang, H.; Zou, D.; Liu, M.; Yang, Y. ; *Anal. Biochem.* **2012**, *421*, 378.
67. Taylor, P.; Toral, M. I.; Nacaratte, F.; Nova, F. *Anal. Letters* **2015**, *48*, 1009.
68. Cincotto, F. H. Detecção dos interferentes endócrinos estradiol e estriol em amostras ambientais e clínicas empregando eletrodos modificados com grafeno, nanopartículas metálicas e quantum dots, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, **2016**.
69. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de química analítica*; 8<sup>a</sup>.; Thomson: São Paulo, 2006.
70. Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O. *Electrochemistry: principles, methods, and applications*; 1<sup>a</sup>.; Oxford University Press Inc.: New York, 1993.
71. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*- ; 2<sup>a</sup>.; Jhon Wiley and Sons, inc.: New York, 2001.
72. Agostinho, S. M. L.; Villami R. F. V.; *Quim. Nova*, **2004**, *27*, 813.
73. Ribeiro, C. L. Determinação eletroanalítica de ácido salicílico em produto dermatológico com eletrodos de nanotubos de carbono e nanopartículas de óxido de ferro, Universidade de Brasília, Dissertação de Mestrado **2016**.
74. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*; 3<sup>a</sup>.; John Wiley and Sons, Inc.: New Jersey, 2006.
75. Kissinger, P. T.; Heineman, W. R.; *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 772.



76. Souza, D. De; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. *Quim. Nova*, **2003**, 26, 81
77. Durst, R. A.; Baumner, A.J.; Murray, R.W.; Buck, R. P.; Andrieux, C. P.; *Pure and Appl. Chem.* **1997**, 69, 1317.
78. Sajid, M.; Nazal, M. K.; Mansha, M.; Alsharaa, A.; Jillani, S. M. S.; Basheer, C. ; *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, 76, 15.
79. Prado, T. M.; Cincotto, F. H.; Moraes, F. C.; Machado, S. A. S. ; *Electroanalysis* **2017**, 29, 1278.
80. Canevari, T. C.; Cincotto, F. H.; Nakamura, M.; Machado, S. A. S.; Toma, H. E.; *Anal. Methods* **2016**, 8, 7254.
81. Schwaminger, S. P.; Bauer, D.; Fraga-García, P.; Wagner, F. E.; Berensmeier, S. ; *CrystEngComm* **2017**, 19, 246.
82. Mphuthi, N. G.; Adekunle, A. S.; Fayemi, O. E. ; *Nat. Publ. Gr.* **2017**, 7, 43181. |
83. R. M. Cornell, U. Schwertmann; *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, 2 ed.; Wiley-VCH : Germany, 2003.
84. Friák, M.; Schindlmayr, A.; Scheffler, M. ; *New J. Phys.* **2007**, 9,5.
85. Jolivet, J. P.; Tronc, E.; Chanéac, C. ; *Comptes Rendus - Geosci.* **2006**, 338, 488.
86. Tartaj, P.; Morales, M. P.; González-Carreño, T.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Serna, C. J. ; *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 290, 28.
87. Khan, U. S.; Amanullah; Manan, A.; Khan, N.; Mahmood, A.; Rahim, A. ; *Mater. Sci. Pol.* **2015**, 33, 278.
88. De Sousa Filho, P. C.; Serra, O. A. ; *Quim. Nova* **2015**, 38, 679.
89. Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. ; *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064.
90. Haumesser, P.-H.; *Nucleation and Growth of Metals: From Thin Films to Nanoparticles*, 1 ed.; Elsevier: United States, **2016**.
91. George, J. M.; Antony, A.; Mathew, B. ; *Microchim. Acta* **2018**, 185, 378.
92. Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; de la Guardia, M. ; *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2015**, 72,1
93. Vayssie, L.; Chane, C.; Tronc, E.; Jolivet, J. P. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 205, 205.
94. Soler, M. A. G. ; *J. Magn. Magn. Mater.* **2018**, 467, 37.
95. Sriram, B.; Govindasamy, M.; Wang, S. F.; Jothi Ramalingam, R.; Al-lohedan, H.; Maiyalagan, T. ; *Ultrason. Sonochem.* **2019**, 58, 104618.
96. Kushwaha, C. S.; Shukla, S. K. ; *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, 2, 2252.
97. Kong, F. Y.; Li, R. F.; Yao, L.; Wang, Z. X.; Li, H. Y.; Lv, W. X.; Wang, W. ;

- Microchim. Acta* **2019**, 186, 177.
98. Liu, Z.; Chen, Z. X.; Jin, B.; Zhang, X. ; *Vib. Spectrosc.* **2011**, 56, 210.
  99. Isvoranu, C.; Wang, B.; Ataman, E.; Schulte, K.; Knudsen, J.; Andersen, J. N.; Bocquet, M. L.; Schnadt, J. ; *J. Chem. Phys.* **2011**, 134, 114710.
  100. Claessens, C. G.; Hahn, U.; Torres, T. ; *Chem. Rec.* **2008**, 8, 75.
  101. Mphuthi, N. G.; Adekunle, A. S.; Ebenso, E. E. ; *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1.
  102. Xu, H.; Xiao, J.; Yan, L.; Zhu, L.; Liu, B. ; *J. Electroanal. Chem.* **2016**, 779, 92.
  103. Karuppiyah, C.; Devasenathipathy, R.; Chen, S. M.; Arulraj, D.; Palanisamy, S.; Mani, V.; Vasantha, V. S. ; *Electroanalysis* **2015**, 27, 485.
  104. Snow, A. W. *Phthalocyanine Aggregation*; Elsevier Inc., 2003; Vol. 17.
  105. Klymchenko, A. ; *J. Nanosci. Lett* **2013**, 3, 21.
  106. de Lima, L. F.; Maciel, C. C.; Ferreira, A. L.; de Almeida, J. C.; Ferreira, M. ; *Mater. Lett.* **2020**, 262, 127186.
  107. Paula, S. A.; Ferreira, O. A. E.; César, P. A. ; *Electroanalysis* **2020**, 32, 86.
  108. Fredj, Z.; Ben Ali, M.; Abbas, M. N.; Dempsey, E. ; *Anal. Methods* **2020**, 12, 3883.
  109. Lu, S.; Hummel, M.; Kang, S.; Gu, Z. ; *J. Electrochem. Soc.* **2020**, 167, 046515.
  110. Karla Lombello Coelho, M.; Nunes da Silva, D.; César Pereira, A. ; *Chemosensors* **2019**, 7, 32.
  111. Cheng, Y.; Liang, J.; Veder, J. P.; Li, M.; Chen, S.; Pan, J.; Song, L.; Cheng, H. M.; Liu, C.; Jiang, S. P. ; *ChemCatChem* **2018**, 10, 475.
  112. [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa\\_link.asp?seq\\_tipo\\_documento=5&cod\\_uo\\_nmeracao=00581&num\\_documento=008](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_nmeracao=00581&num_documento=008), acessado em Agosto de 2020.
  113. AOAC, Guidelines for Standard Method Performance Requirements; *AOAC Off. METHODS Anal.* **2016**.
  114. ICH; International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: methodology. Q2B (CPMP/ICH/281/95), **1995**.
  115. Jolivet, J. P.; Tronc, E. ; *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, 125, 688.
  116. Khoh, W. H.; Hong, J. D. ; *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, 436, 104.
  117. Massart, R. ; *IEEE Trans. Magn.* **1981**, 17, 1247.
  118. Zins, D.; Cabuil, V.; Massart, R. ; *J. Mol. Liq.* **1999**, 83, 217.
  119. Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P. ; *Chem. Mater.* **1996**, 8, 2209.
  120. Santos, J. G. M.; Souza, J. R.; Letti, C. J.; Soler, M. a G.; Morais, P. C.; Paterno, L. G. ; *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, 6614.

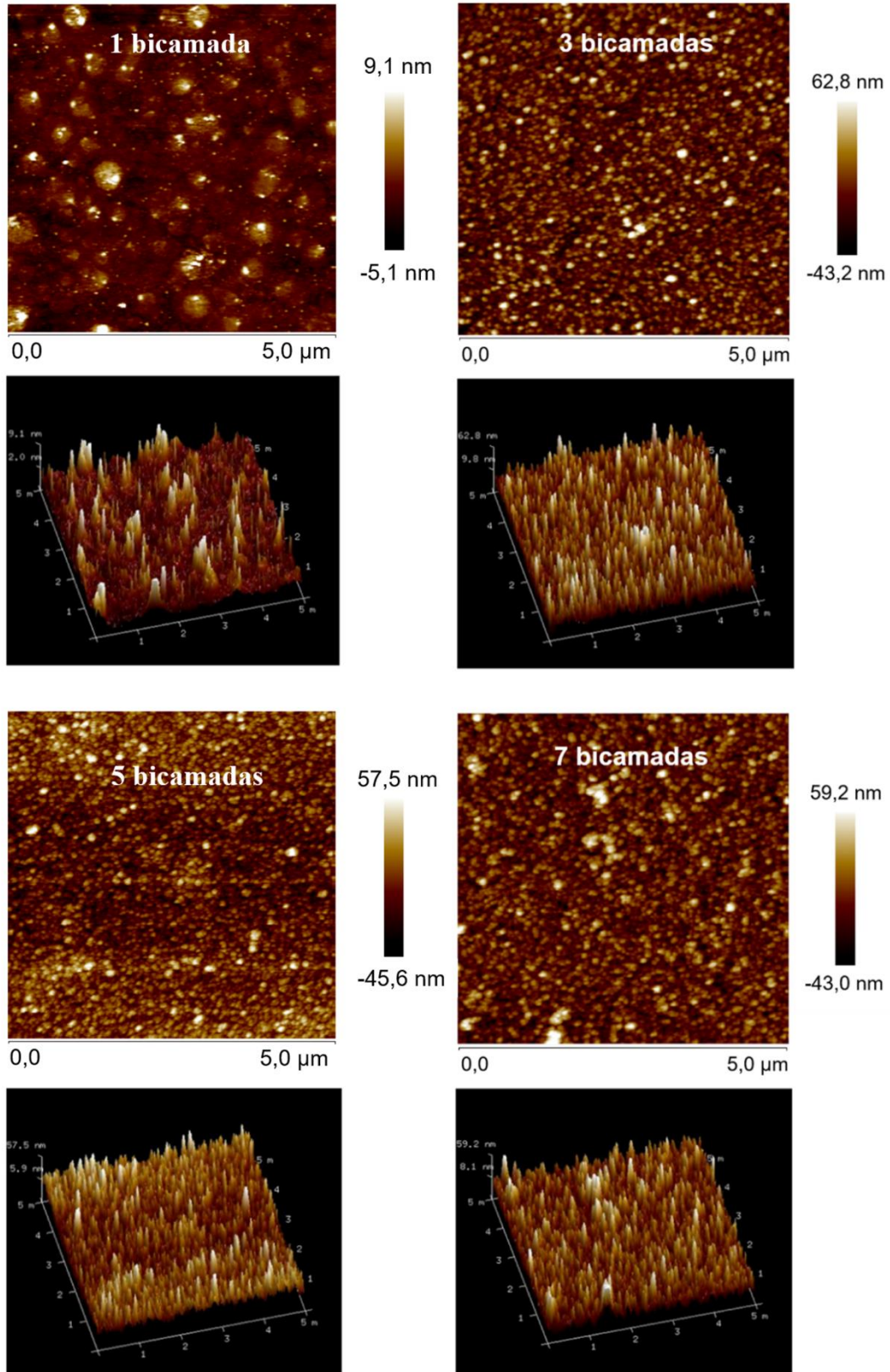
121. Paterno, L. G.; Soler, M. A. G. *JOM* **2013**, *65*, 709.
122. Deroco, P. B.; Vicentini, F. C.; Oliveira, G. G.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. ; *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *719*, 19.
123. Gimenes, M. L.; Mendes, E. S. ; *Acta Sci. Technol.* **2000**, *22*, 1235.
124. Filomeno, C. L. Dispersões de Nanopartículas Magnéticas do tipo Core-Shell  $MFe_2O_4@ \gamma - Fe_2O_3$  em Solventes Polares: Reatividade Eletroquímica e o papel da Interface Óxido/Solução nas Propriedades Coloidais. Universidade de Brasília, Tese de Doutorado **2015**.
125. R. M. Cornell, U. Schwertmann; *Iron Oxides in the laboratory: Preparation and characterization*, 2 ed.; Wiley-VCH : Germany, **2000**.
126. Bishnoi, A.; Kumar, S.; Joshi, N. *Wide-Angle X-ray Diffraction (WXR)*; Elsevier Inc., 2017.
127. Callister, W. D., Rethiwisk, D. G. *Ciência e engenharia dos materiais uma introdução*, 8 ed, LTC: Rio de Janeiro, **2012**.
128. Ribeiro, C. de L.; Santos, J. G. M.; de Souza, J. R.; Pereira-da-Silva, M. A.; Paterno, L. G. ; *J. Electroanal. Chem.* **2017**, *805*, 53.
129. Chen, H.; Chang, X.; Du, D.; Liu, W.; Liu, J.; Weng, T.; Yang, Y.; Xu, H.; Yang, X. ; *J. Control. Release* **2006**, *110*, 296.
130. <https://www.materials-talks.com/blog/2017/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/> acessado em Outubro de 2020.
131. Alcantara, G. B.; Paterno, L. G.; Fonseca, F. J.; Morais, P. C.; Soler, M. A. G. ; *J. Magn. Mater.* **2011**, *323*, 1372.
132. Rodriguez-Mendez, M. L.; Antonio de Saja, J. ; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2009**, *13*, 606.
133. Ishikawa, N.; Kaizu, Y. ; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1999**, *3*, 514.
134. Santos, A. C.; Luz, R. A. S.; Ferreira, L. G. F.; Ribeiro, J.; Silva, C.; Crespilho, F. N. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 539.
135. George, R. C.; Durmuş, M.; Egharevba, G. O.; Nyokong, T. ; *Polyhedron* **2009**, *28*, 3621.
136. Isago, H. ; *Opt. Spectra Phthalocyanines Relat. Compd.* **2015**, *21*.
137. Chen, C.; Ma, Z.; Zhou, S.; Li, T.; Sun, X. ; *Catal. Letters* **2017**, *147*, 2399.
138. Silva, J. C. O.; Sousa, M. H.; Tourinho, F. A.; Rubim, J. C. *Langmuir* **2002**, *18*, 5511.
139. Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Cordeiro, M. R.; Constantino, C. J. L.; Moreira, W. C.; Oliveira, O. N. ; *Sensors Actuators, B Chem.* **2006**, *113*, 809.

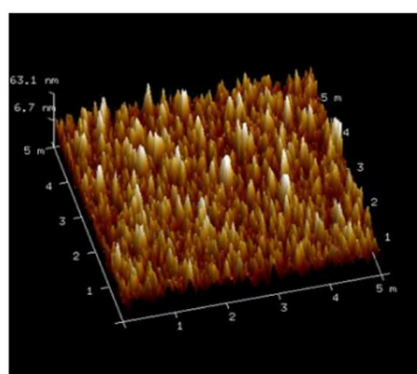
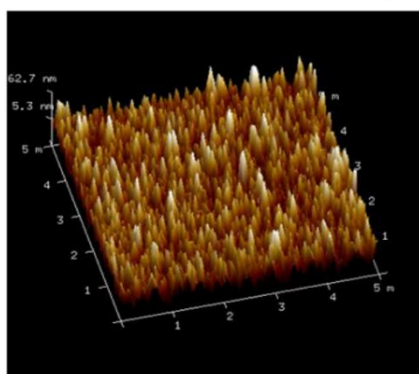
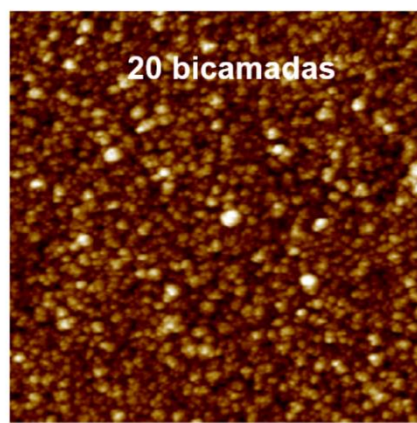
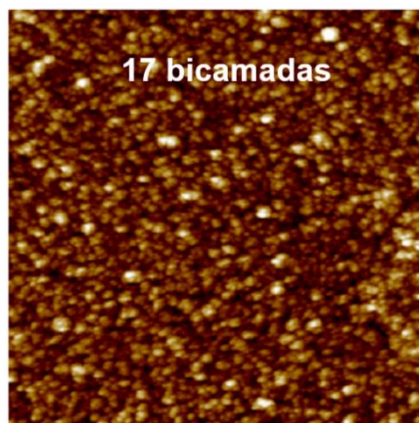
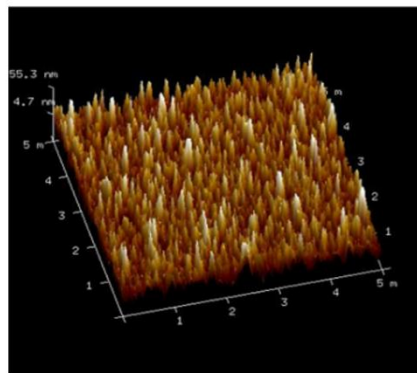
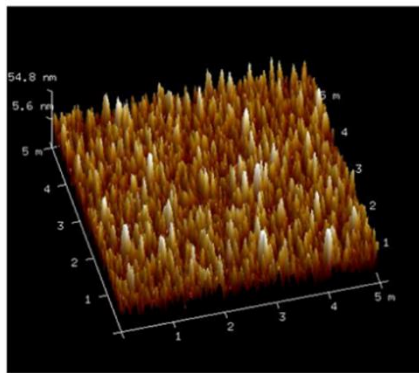
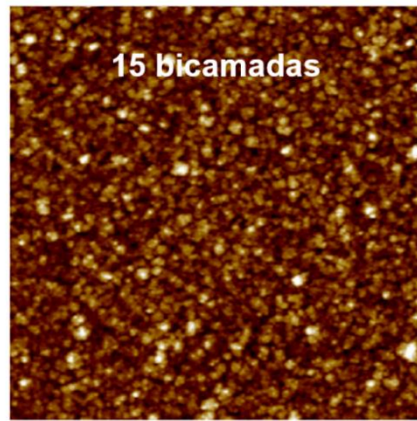
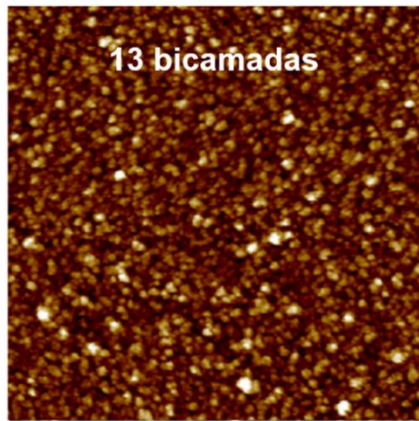
140. Alencar, W. S.; Crespilho, F. N.; Martins, M. V. A.; Zucolotto, V.; Oliveira, O. N.; Silva, W. C. ; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 5086.
141. Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Siqueira, J. R.; Carvalho, A. J. F.; Nart, F. C.; Oliveira, O. N. ; *Int. J. Electrochem. Sci.* **2006**, *1*, 151.
142. de Lucena, N. C.; Miyazaki, C. M.; Shimizu, F. M.; Constantino, C. J. L.; Ferreira, M. ; *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *436*, 957.
143. Santos, C. S.; Ferreira, R. T.; Calixto, C. M. F.; Rufino, J. L.; Garcia, J. R.; Fujiwara, S. T.; Wohnrath, K.; Pessoa, C. A. ; *J. Appl. Electrochem.* **2014**, *44*, 1047.
144. Moraes, F. C.; Golinelli, D. L. C.; Mascaro, L. H.; MacHado, S. A. S. ; *Sensors Actuators, B Chem.* **2010**, *148*, 492.
145. Alencar, W. S.; Crespilho, F. N.; Santos, M. R. M. C.; Zucolotto, V.; Oliveira, O. N.; Silva, W. C. ; *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 12817.
146. Jin, W.; Moats, M. S.; Zheng, S.; Du, H.; Zhang, Y.; Miller, J. D. ; *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 8311.
147. Antoniazzi, C.; Lima, C. A. De; Marangoni, R.; Spinelli, A.; *J. Solid State Electrochem.* **2017**, *22*, 1373.
148. Elzbieciak-Wodka, M.; Kolasińska-Sojka, M.; Nowak, P.; Warszyński, P. ; *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *738*, 195.
149. Ghoneim, E. M.; Ghoneim, M. M. ; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 255.
150. Ngundi, M. M.; Sadik, O. A.; Yamaguchi, T.; Suye, S. ichiro ; *Electrochem. commun.* **2003**, *5*, 61.
151. Hurwitz, A. R.; Liu, S. T. ; *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 624.
152. Randviir, E. P.; Banks, C. E. ; *Anal. Methods* **2013**, *5*, 1098.
153. Nelms, R. M.; Tatarchuk, B. J. ; *IEEE Trans. Ind. Appl.* **2001**, *37*, 4.
154. Torikai, K.; Furlan De Oliveira, R.; Starnini De Camargo, D. H.; Bof Bufon, C. C. ; *Nano Lett.* **2018**, *18*, 5552.
155. Li, C. ; *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 263.
156. Cesarino, I.; Cincotto, F. H.; Machado, S. A. S. ; *Sensors Actuators B. Chem.* **2015**, *210*, 453.
157. Martínez, N. A.; Pereira, S. P.; Bertolino, F. A.; Schneiderb, R. J.; Messina, G. A. M.; Raba, J. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *723*, 27.
158. Smajdor, J.; Piech, R.; Pięk, M.; Paczosa-Bator, B. ; *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164*, H885.

159. Cincotto, F. H.; Martínez-garcía, G.; Yáñez-sedeño, P.; Canevari, T. C.; Machado, S. A. S.; Pingarrón, J. M. ; *Talanta* **2015**, *147*, 328.
160. Nunes, C. N.; Pauluk, L. E.; Felsner, M. L.; Egéa, V.; Quináia, S. P. ; *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, *2016*, 1.
161. Perez, C.; Simões, F. R.; Codognoto, L. ; *J. Solid State Electrochem* **2015**, *20*, 2471.
162. Pavinatto, A.; Mercante, L. A.; Facure, M. H. M.; Pena, R. B. ; *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *458*, 431.
163. de Jesus, V. O.; Ferreira, V. S.; Lucca, B. G. ; *Talanta* **2020**, *210*, 120610.
164. Zheng, Z. xiang; Wang, M.; Shi, X. zhao; Wang, C. ming ; *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14162.
165. Nodehi, M.; Baghayeri, M.; Ansari, R.; Veisi, H. ; *Mater. Chem. Phys.* **2020**, *244*, 122687.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Imagens 2D e 3D de microscopia de força atômica do filmes (NiTsPc/ION) com diferentes números de bicamadas





## 9.2 Artigos publicados

THE JOURNAL OF  
PHYSICAL CHEMISTRY C

pubs.acs.org/JPC

Article

## Electrocatalytic Oxidation of Ethinyl Estradiol by an Iron Oxide Nanoparticle/Nickel Phthalocyanine Supramolecular Electrode

Camila de L. Ribeiro, Jurandir Rodrigues de Souza, Marcelo A. Pereira-da-Silva, Vianney O. Santos, Jr., and Leonardo G. Paterno\*

Cite This: *J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 19057–19069

Read Online

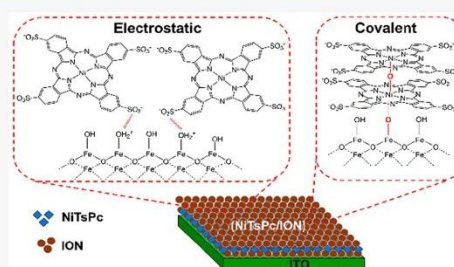
ACCESS |

Metrics &amp; More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Indium-doped tin oxide (ITO) substrates were surface-modified with layer-by-layer nanocomposite films of anionic nickel(II) tetrasulfonated phthalocyanine (NiTsPc) and positively charged iron oxide nanoparticles (IONs) aiming at the electrocatalytic oxidation of ethinyl estradiol (EE2). Atomic force microscopy and UV–vis and Raman spectroscopies suggest that the successive deposition of NiTsPc/ION bilayers forms a porous supramolecular structure driven by both electrostatic interaction and covalent Fe(III)–O–Ni(II) bridges. Cyclic and differential pulse voltammetry show that EE2 is effectively oxidized at the ITO/(NiTsPc/ION) electrode while displaying an isolated and well-defined peak at +0.73 V (vs Ag/AgCl). Conversely, bare ITO and ITO modified by either ION or NiTsPc alone are unable to oxidize EE2. The benefit of the NiTsPc/ION bilayers for the EE2 oxidation is assigned to the charge-transfer process occurring between IONs and NiTsPc through the Fe(III)–O–Ni(II) bridge. This process suppresses the oxidation of both the phthalocyanine ring and Ni(II), which appear in the same potential range of EE2 oxidation and allow the electrons to be transferred from EE2 adsorbed onto IONs to the ITO substrate underneath. Therefore, this new sensing platform operates under a particular working principle in which analyte oxidation and subsequent charge transport are separately performed by its individual components.



## INTRODUCTION

Iron oxides are ubiquitous in nature, appearing in different forms and functions in several biological and geological processes.<sup>1</sup> More recently, their nanosized counterparts, namely, iron oxide nanoparticles (IONs), have been widely employed in many fields of science and technology, ranging from spintronics to biomedicine.<sup>2,3</sup> Owing to easy preparation at low cost and quantum-confinement-related properties—superparamagnetism, giant magnetoresistance, hyperthermia, and enhanced catalytic activity—IONs are nowadays taking part of practical devices for stimuli-responsive materials,<sup>4</sup> ferrofluids,<sup>5</sup> magnetic hyperthermia,<sup>6</sup> magnetic resonance imaging,<sup>7</sup> catalysis,<sup>8</sup> energy conversion,<sup>9</sup> and sensors.<sup>10–12</sup>

The electrocatalytic activity of IONs has been successfully exploited in electrochemical sensors. They exhibit surface iron oxyhydroxides showing mixed valence states and strong Lewis acidity, which play pivotal roles in the oxidation and reduction and in the adsorption of analytes.<sup>10–13</sup> Nonetheless, IONs alone are still deficient of proper electronic conductivity, even though that is essential to better establish the electronic communication between the solution and electrode. This deficiency is addressed by introducing a conducting element within the electrode architecture.

Carbon-based nanomaterials such as graphene oxide (GO), reduced graphene oxide (RGO), and carbon nanotubes (CNT) have been chosen to support IONs and to serve as electrical conductors. These hybrid nanostructures have been predominantly used for the electrochemical determination of analytes of biomedical concern, including dopamine,<sup>14,15</sup> antituberculosis drugs,<sup>16</sup> DNA,<sup>17</sup> the mosaic virus gene,<sup>18</sup> rizatriptan,<sup>19</sup> chlorpromazine,<sup>20</sup> uric acid,<sup>21</sup> and salicylic acid,<sup>22,23</sup> to name but a few.

Metallophthalocyanines (MPc) have also been associated with IONs for electrochemical sensing, while playing the roles of electronic conductor and electrocatalysts simultaneously.<sup>24,25</sup> MPc's are transition-metal complexes composed of a conjugated macrocyclic framework containing 18  $\pi$ -electrons (the phthalocyanine ring) and an N4 inner structure (isoindole moieties) to which transition-metal ions are coordinated. Both the macrocycle and the central metal ion are susceptible to

Received: May 27, 2020

Revised: July 26, 2020

Published: August 4, 2020



ACS Publications

© 2020 American Chemical Society

19057

https://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04796  
*J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 19057–19069



redox reactions, which can lower the overpotential of oxidation/reduction of different molecules, thus making them very attractive elements for energy storage and electrochemical sensor devices.<sup>26</sup> For example, ION-MPc hybrids have achieved relative success as electrocatalysts in oxygen and carbon dioxide reduction reactions (ORR and CO<sub>2</sub>RR).<sup>27,28</sup> For the case of ION-FePc, it has been suggested that the iron ions from the oxide nanoparticle interact with the active center of FePc, enhancing the electron transition and reversibility of the Fe(III)/Fe(II) redox pair and ultimately leading to faster ORR kinetics.<sup>27</sup> For the case of ION-MPc, where M is Co or Ni, an even more intriguing mechanism is proposed under which the central ion in the MPc is replaced by iron ions from IONs during the cathodic scan. A new electrocatalyst is thus formed *in situ*, in which iron ions of higher valence states (Fe(IV) and Fe(V)) are stabilized by the Pc macrocycle, thereby producing more acidic sites that accelerate the CO<sub>2</sub>RR.<sup>28</sup> As for electrochemical sensing, the role played by MPc in electrodes without IONs is also well established. In the detection of dopamine in the presence of ascorbic acid,<sup>29</sup> epinephrine,<sup>30</sup> and nitrite,<sup>31</sup> the redox reactions at the central metal ion are coupled with analyte oxidation, increasing the measured current. When IONs and MPc are used together, the exact roles played by IONs and MPc alone in the sensing process are, however, not deciphered, although the analyte oxidation is improved and the measured current also increases.<sup>24,25</sup>

Herein, we propose a novel working electrode made of indium-doped tin oxide (ITO) substrates being surface-modified with layer-by-layer (LbL) nanocomposite films of anionic nickel(II) tetrasulfonated phthalocyanine (NiTsPc) and positively charged iron oxide nanoparticles (IONs) to study the electrochemical oxidation of ethinyl estradiol (EE2) and address the roles played by each electrode component. The LbL process is chosen because it is quite simple and can be applied to virtually any kind of material, especially those aimed at electrochemical sensing.<sup>32–34</sup> IONs have been previously combined with CNT in an LbL-assembled electrode for the detection of salicylic acid.<sup>22,23</sup> Nonetheless, CNTs are less soluble and much more expensive than NiTsPc, which makes the present (NiTsPc/ION) electrode much more affordable. In addition, it has been observed that the LbL assembly of NiTsPc/ION films is driven by coordination beyond the expected electrostatic interaction. This unusual supramolecular structure, which was made possible only by the LbL process, has been detected by UV–vis and micro-Raman spectroscopies as well as cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, and electrochemical impedance spectroscopy. Its presence was found to be indispensable for the proper electrooxidation of EE2. EE2 is a very effective estrogen that displays strong endocrine disruptive activity.<sup>35</sup> Because of its widespread use and incomplete metabolism in the human body, it has been found in surface waters.<sup>36</sup> Therefore, monitoring actions are highly desirable to mitigate its harmful effects.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** Nickel(II) phthalocyanine-tetrasulfonic acid tetrasodium salt (NiTsPc), K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, poly(sodium-4-styrenesulfonate) (PSS, Mw 70 000 g mol<sup>-1</sup>), poly(diallyl dimethylammonium chloride) (PDAC, Mw 450 000 g mol<sup>-1</sup>), ethinyl estradiol (EE2) 98%, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, and FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O were all purchased from Sigma-Aldrich (USA)

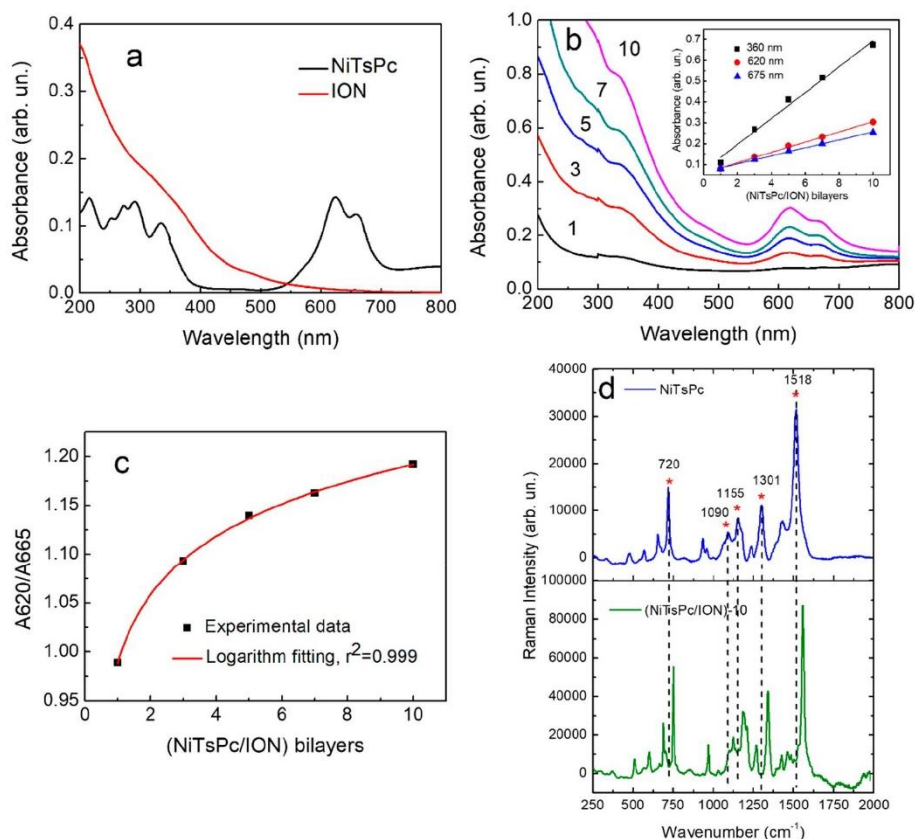
and used as received. HCl 37%, HClO<sub>4</sub> 70%, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, NH<sub>4</sub>OH 28%, KCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, sodium acetate, and glacial acetic acid were all purchased from Merck (Germany) and used without additional purification. All water used for the ION synthesis, substrate cleaning, and preparation of solutions/suspensions was of the ultrapure type (18 MΩ cm resistivity) provided by a Milli-Pore Milli-Q water purification system. Quartz and indium-doped tin oxide (ITO, 15 Ω sq resistivity) slides (1.0 mm × 10.0 mm × 25 mm) were used as substrates for film deposition.

**Sample Preparation.** The ION sample was prepared by the alkaline coprecipitation of Fe(II)/Fe(III) ions following the procedure described previously.<sup>23</sup> In the first step, 20 mL of an acidic solution of 0.1 mol L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.2 mol L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O was added dropwise to 80 mL of a 1 mol L<sup>-1</sup> solution of NaOH kept under intense magnetic stirring and room temperature (25 °C). Afterward, the mixture was stirred for another 30 min. The as-formed black precipitate composed of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles was decanted with the aid of a magnet and rinsed three times with ultrapure water until the supernatant pH was neutral. The solid was divided in two portions; one was dried in a vacuum desiccator for micro-Raman and X-ray diffractometry analysis and the other was suspended in HClO<sub>4</sub> (pH 4.0) for film deposition.

The quartz substrates were cleaned sequentially in piranha solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3:1 v/v) and alkaline solution (NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O 5:1:1 v/v) and finally stored in ultrapure water, whereas ITO substrates were cleaned with neutral detergent in an ultrasonic bath (80 W) for 20 min, rinsed, and stored in ultrapure water.

PDAC, PSS, and NiTsPc solutions at 1.0 g L<sup>-1</sup> were prepared in aqueous HCl solution (pH 4.0) by magnetic stirring for 30 min. ION at 5.0 g L<sup>-1</sup> was prepared in aqueous HClO<sub>4</sub> (pH 4.0). The LbL deposition was performed manually and at room temperature (25 °C). All film samples started with a PDAC/PSS bilayer to enhance the adhesion of subsequent bilayers. According to the literature, the isoelectric points of quartz and ITO are, respectively, 2.9 and 8.5.<sup>37,38</sup> Therefore, exclusively for the deposition of the primer layer, the PDAC solution was used at pH 9 in order to permit its electrostatic interaction with negatively charged quartz and ITO substrates. In summary, the chosen substrate was successively immersed into the cationic and anionic materials' solutions/suspensions in alternating fashion for 5 min each. After each material was deposited, the substrate + material was immersed in a magnetic stirred HCl (pH 4) solution for rinsing and eliminating weakly adsorbed material, followed by blow drying with compressed air. The execution of this deposition cycle resulted in a cationic/anionic material bilayer, and it was repeated for 10 bilayers. In order to demonstrate the relevance of the synergistic combination of NiTsPc and IONs for the electrocatalytic oxidation of EE2, three electrode architectures were prepared by LbL: (NiTsPc/ION), (PSS/ION), and (PDAC/NiTsPc). The simple mixing of NiTsPc and IONs in the same solution immediately led to precipitation. The as-formed precipitated could not be redispersed by all means, thereby making it impossible to deposit a film. Therefore, only electrodes modified by LbL deposition could be tested.

**Instruments and Sample Characterization.** The solid ION sample was analyzed by X-ray diffractometry (Bruker D8 Focus, λ = 1.5418 Å (Cu Kα), 0.1° min<sup>-1</sup>, resolution 0.5°), whereas the ION suspension was characterized by electrophoretic mobility and dynamic light scattering (Malvern Zeta



**Figure 1.** UV–vis absorption spectra of (a) NiTsPc solution and ION suspension and (b) the (NiTsPc/ION) film with a different number of bilayers where the inset shows the dependence of the film's absorbance on the number of bilayers at 360 nm ( $r^2 = 0.986$ ), 620 nm ( $r^2 = 0.987$ ), and 675 nm ( $r^2 = 0.996$ ). (c) Relative ratio between absorbances related to aggregated and monomeric species ( $A_{620}/A_{665}$ ) as a function of the (NiTsPc/ION) bilayers. (d) Raman spectra of plain NiTsPc and the (NiTsPc/ION)-10 film. Samples were excited at 632.8 nm.

sizer NanoZ590) and transmission electron microscopy (Jeol Jim 1011, 80 kV). The film samples were analyzed by UV–vis (Varian Cary 5000, scan rate  $0.1 \text{ nm min}^{-1}$ , resolution 1 nm) and micro-Raman (InVia Renishaw, excitation at 632.8 nm, 25 mW operating power, resolution  $1 \text{ cm}^{-1}$ ). The InVia Raman system was equipped with a Leica microscope and a  $50\times$  objective lens that was used to focus the laser beam on the sample and to collect the scattered radiation (backscattering configuration). A 1200 lines/mm grating was used to record the spectra. The detector was a thermoelectrically cooled charge-coupled device. All spectra were acquired in confocal mode to minimize the spectral contamination. The surface morphology of samples was imaged by scanning electron microscopy (SEM) with a Jeol JSM 7001F microscope and by atomic force microscopy (AFM) using a Bruker Dimension ICON nanoscope (silicon tips, cantilever spring constant  $40 \text{ N m}^{-1}$ ).

**Electrochemical Characterization.** Cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) experiments were carried out in a three-electrode configuration glass cell (70 mL, Ag/AgCl reference electrode, Pt wire counter electrode, and ITO modified with the nanocomposite as a working electrode)

using a Metrohm potentiostat/galvanostat (Autolab PGSTAT 204) provided with the FRA 2 module for EIS (100 MHz to 0.1 Hz; 10 points per decade, amplitude of 50 mV and cell potential of +0.75 V). All electrochemical data were registered and analyzed with NOVA 1.11 software. A stock solution of EE2 ( $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) was prepared in ethanol and diluted with sodium acetate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4.5) until the desired concentrations for the electrochemical tests.

## RESULTS AND DISCUSSION

**NiTsPc/ION Layer-by-Layer Deposition.** Figure S1 provides the structural characteristics of IONs. The X-ray diffractogram shown in Figure S1a confirms the cubic iron oxide in the inverted spinel structure with a lattice parameter of  $8.377 \text{ \AA}$  (determined by the Scherrer formula using the most intense diffraction peak, (311)). This value is found between that of magnetite ( $8.397 \text{ \AA}$ ) and maghemite ( $8.3515 \text{ \AA}$ ), thereby suggesting that the ION sample is composed of a mixture of both phases. A typical TEM micrograph of the ION sample is provided in Figure S1b, along with the size distribution fitted by a log-normal function (Figure S1c). They respectively show nearly spherical particles with a mean diameter of  $8.72 \pm 0.24 \text{ nm}$ . The zeta potential of ION is

**Table 1. Raman Band Assignments for Plain NiTsPc and (NiTsPc/ION)-10**

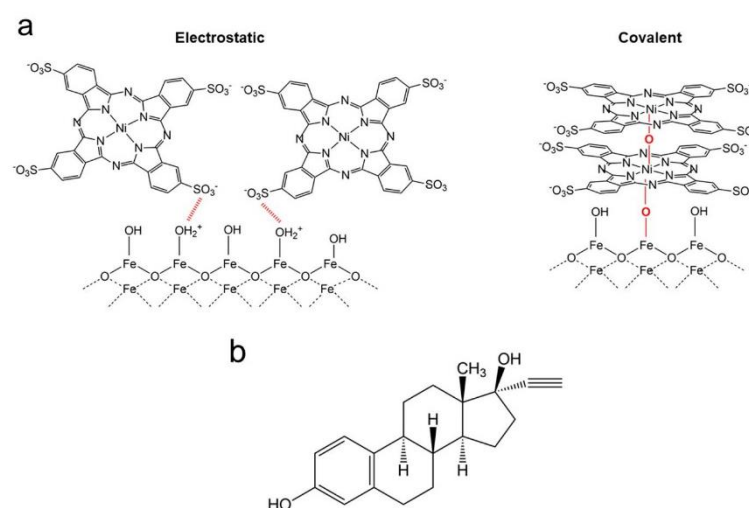
plain NiTsPc	(NiTsPc/ION)-10	shift (cm <sup>-1</sup> )	assignment
720	751	+31	macrocycle vibration
1090	1124	+34	-SO <sub>3</sub> stretching
1155	1184	+29	C-H bending
1301	1338	+37	isoindole N-Ni stretching; C-N-C in-plane bending
1518	1559	+39	C=C, C=N pyrrole stretching; C-N-C stretching; pyrrole expanding; C-H in-plane bending

positive and equal to  $+46 \pm 1$  mV, which is due to protonated iron oxyhydroxide surface groups.

The LbL deposition of charged materials such as polyelectrolytes and colloidal particles relies on the mutual electrostatic interactions (e.g., ionic pairing, charge compensation, etc.) established between cationic and anionic sites of each film constituent to ensure adsorption and achieve stability.<sup>39,40</sup> Depending upon the chemical structure of the chosen material, some other secondary forces may also contribute to the film assembly, for example, hydrogen bonding and charge transfer complexation.<sup>39</sup> Less frequent in the LbL deposition, however, is the attainment of adsorption by means of covalent bonds. This is because of the formation of covalent bond demands for materials with quite specific chemical functionalities. In addition, one of the most advanced applications requires multilayered films, and the chemical reaction in each deposition cycle must necessarily occur at high yields (virtually 100%); otherwise, the multilayer buildup will end prematurely. Herein, it is verified that NiTsPc and ION adsorb on each other not only by charge compensation but also by coordination via Ni(II)-O-Fe(III) oxo bridges. Indeed, this unusual supramolecular structure is found to be essential to the electrocatalytic activity of the NiTsPc/ION multilayered electrode toward EE2 oxidation.

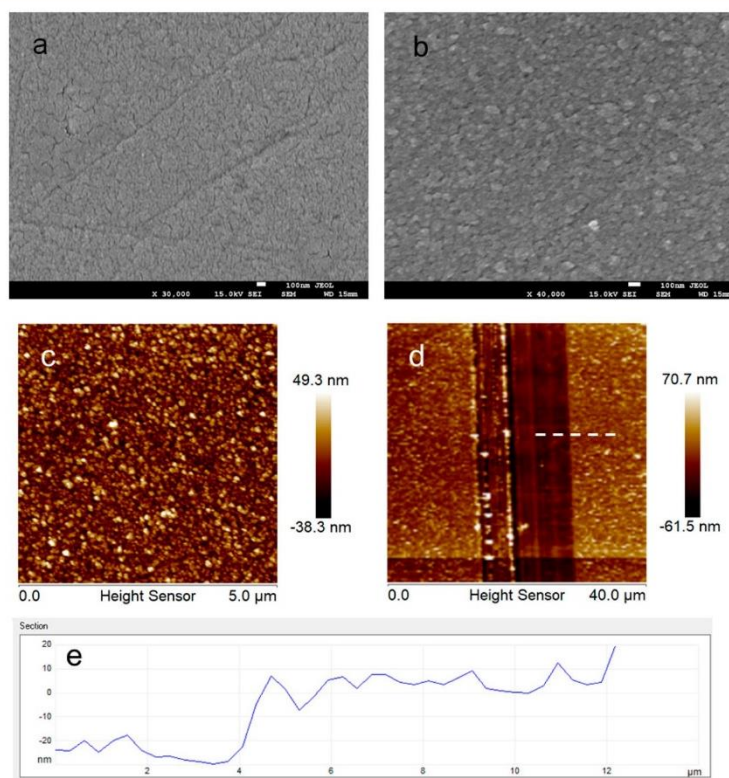
Figure 1 provides some structural characterization of plain NiTsPc and ION as well as NiTsPc/ION films, carried out by

UV-vis and micro-Raman spectroscopies. The UV-vis spectrum of the NiTsPc solution (Figure 1a) shows three main electronic transitions, which are ascribed to  $n-\pi^*$  (291 nm), the B- or Soret band (335 nm), and the Q-band (625 nm). The Q-band is clearly formed by two main components, a stronger absorption at 625 nm accompanied by a weaker one at 658 nm. The absorption at 625 nm is regarded as aggregates, which in solution assume the form of dimerized species, whereas the one peaking at 658 nm stands for individual molecules.<sup>41</sup> On the other hand, the UV-vis spectrum of the ION suspension (Figure 1a) shows only a structureless band peaking at 360 nm, which is ascribed to the O 2p  $\rightarrow$  Fe 4d electron transfer process in the inverted spinel crystal structure.<sup>22,23</sup> The spectra of NiTsPc/ION bilayers (Figure 1b) resemble very much those of the NiTsPc solution and ION suspension. In addition, the absorbances at the corresponding main absorption peaks increase linearly with the number of NiTsPc/ION adsorbed bilayers, as shown by the inset of Figure 1b, meaning that fixed amounts of NiTsPc and ION are adsorbed per deposition cycle (or bilayer). This behavior has been observed by different authors when the LbL assembly of NiTsPc is performed by means of electrostatic interactions with doped poly(aniline),<sup>29</sup> poly(allylamine hydrochloride)-coated gold nanoparticles,<sup>42</sup> chitosan,<sup>43</sup> montmorillonite clay,<sup>44</sup> and 3-n-propylpyridinium silsesquioxane polymer.<sup>45</sup> It is important to note that after NiTsPc is immobilized within the NiTsPc/ION film the Q-band is blue-shifted by 5 nm, possibly due to the formation of H-aggregates. In H-aggregates, the phthalocyanine molecules stack onto each other in a coplanar manner, where the transition dipole moment of each individual molecule is oriented 90° apart from the stacking axis.<sup>46</sup> The Ni(II) ion in the center of the molecule, however, limits the closer approximation of two different NiTsPc molecules for  $\pi$ -stacking. Instead, different NiTsPc molecules are connected to each other through Ni(II)-O-Ni(II) oxo bridges.<sup>47</sup> More interesting, Figure 1c shows that the relative ratio between aggregated and monomeric species, as represented by (A620/A665), increases

**Scheme 1. (a) Proposed Models for the Electrostatic and Covalent (via Oxobridge) Interactions between NiTsPc and ION in the (NiTsPc/ION) LbL Film and (b) Structural Formula of EE2**

19060

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04796>  
J. Phys. Chem. C 2020, 124, 19057–19069



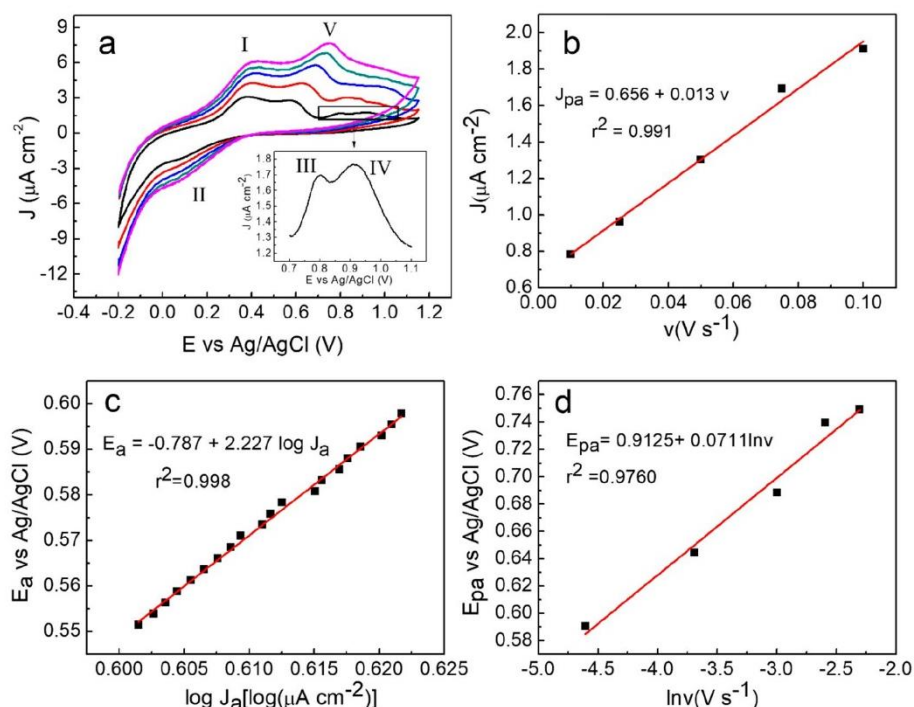
**Figure 2.** SEM images of (a) bare ITO and (b) ITO/(NiTsPc/ION)-10. Scale bars: 100 nm. AFM images of ITO/(NiTsPc/ION)-10 in (c)  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  and (d)  $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$  scan windows and (e) surface profile along the white dashed line shown in (d).

with the number of deposited NiTsPc/ION bilayers. This result is in contrast to that found by Zucolotto et al., who observed the predominance of monomeric NiTsPc when being LbL assembled with doped poly(aniline).<sup>29</sup> Assuming that Ni(II)–O–Ni(II) bridges are present in the NiTsPc/ION films, one should expect the existence of Fe(III)–O–Ni(II) as well. Chen et al. have prepared nanocomposites of cobalt-tetracarboxyl-phthalocyanine linked with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan microspheres for dye degradation.<sup>48</sup> After structural analysis performed by FT-IR, UV–vis, and XPS spectroscopies, they concluded that the phthalocyanine molecules were linked to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> by electrostatic bonds, H-bonds, and coordination bonds as well, with the latter established by Co(II)–O–Fe(III) oxo bridges. Silva et al. have studied the adsorption of ZnTsPc onto maghemite nanoparticles by different spectroscopy methods and admitted the possibility of covalent bonding between these two materials.<sup>49</sup>

In order to ascertain this possibility, micro-Raman spectra of plain NiTsPc and (NiTsPc/ION)-10 film samples were compared in Figure 1d. The spectra were obtained using 632.8 nm excitation, which is in resonance with the NiTsPc Q-band to enhance the signal-to-noise ratio. The main Raman modes expected for NiTsPc, according to the literature,<sup>29,49</sup> are observed in both samples; they are marked with an asterisk and listed in Table 1. Comparatively, there is seen a systematic shift of all vibrational modes to higher wavenumbers when going from plain NiTsPc to the (NiTsPc/ION)-10 film. The observed shifts are ascribed to the strengthening of chemical

bonds in NiTsPc as caused by the interactions with alike molecules due to the formation of aggregates as well as by interaction with ION. Whereas the shift of the  $-\text{SO}_3^-$  stretching is assigned to the ionic complexation with positively charged Fe(III) oxyhydroxy groups at the ION surface, the shift of all other modes can be attributed to the interaction between Ni(II) and Fe(III) through oxo bridges. Since the shifts are above  $30 \text{ cm}^{-1}$ , it is concluded that the LbL assembly of NiTsPc/ION films is driven by both electrostatic interaction and coordination. Scheme 1 illustrates the possible modes of interaction between NiTsPc and ION. This unusual supra-molecular structure is found to be indispensable for the effective electrooxidation of EE2, as will be shown later.

The morphology of (NiTsPc/ION) films was evaluated by SEM and AFM images, as shown in Figure 2. In Figure 2a, the morphology of bare ITO shows a rather rough texture alongside some cracks. This morphology is completely changed after the deposition of the (NiTsPc/ION)-10 film, which is now composed of numerous aggregates providing an even rougher surface. Its respective AFM image (Figure 2c) confirms that the aggregates are indeed formed by spherical nanoparticles, corroborating the TEM image of ION (Figure S1b). AFM images of films with a variable number of bilayers (not shown) exhibited identical morphology. The image in Figure 2d shows the same sample scanned over a wider area in which a furrow was carved with the AFM tip, following the procedure originally reported by Lobo et al.<sup>50</sup> It is possible to see the contrast between the smoother ITO and the rougher



**Figure 3.** (a) Cyclic voltammograms of the (NiTsPc/ION)-10 film in sodium acetate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4.5 at different scan rates (10–100 mV s<sup>-1</sup>)), (b) dependence of the oxidation current density ( $J_{pa}$ ) on the scan rate, (c) Tafel's plot of peak V at 50 mV s<sup>-1</sup>, and (d) dependence of the peak potential ( $E_{pa}$ ) on  $\ln v$ .

(NiTsPc/ION) film. The surface profile traced across the white dashed line is provide in Figure 2e and reveals the thickness of (NiTsPc/ION) to be about 35 nm.

**Electrochemical Behavior of the (NiTsPc/ION) Electrode.** Figure 3 reports on the electrochemical kinetics within the (NiTsPc/ION)-10 film studied by CV in sodium acetate buffer (pH 4.5), which was chosen on the basis of a previous optimization study. Figure 3a shows CV registered at increasing scan rates (10, 25, 50, 75, and 100 mV s<sup>-1</sup>). Peaks I and II are ascribed to the oxidation/reduction of iron oxyhydroxy groups at the ION surface. Their positions are almost independent of the scan rate, indicating that they refer to a reversible redox pair. After using the Nicholson method as reported by Bard,<sup>51</sup> the number of electrons was found to be 1. In contrast, peaks III and IV, which correspond to [TsPc]<sup>6-</sup>/[TsPc]<sup>5-</sup> and Ni<sup>2+</sup>/Ni<sup>3+</sup> oxidation reactions occurring in NiTsPc molecules,<sup>43,52</sup> are observable only under low scan rates (10 and 25 mV s<sup>-1</sup>). At higher scan rates, they merge into a single undefined peak, suggesting that these reactions are slow and irreversible. Indeed, they have no corresponding cathodic waves, even though previous contributions have reported them.<sup>52</sup> An additional peak (peak V), which is observable at all applied scan rates, was also noted, although its position shifts to higher potentials, as indicative of irreversibility. It is hypothesized that this peak correspond to a charge-transfer complex formed between Fe(III) (from ION) and Ni(II) (from NiTsPc) by means of an oxo bridge, as suggested by UV-vis and Raman spectroscopy data discussed in Figure 1. In fact, Figure 3b shows a linear dependence ( $r^2 = 0.991$ ) between the current density of peak V and the scan

rate, which thus confirms the charge-transfer mentioned above. An attempt to fit by a straight line the current density at this peak with the square root of the scan rate resulted in a worse correlation coefficient ( $r^2 = 0.939$ ), thereby ruling out a diffusion-controlled process. The number of electrons involved in the charge transfer was determined in two steps. First, a Tafel's plot was constructed, as shown in Figure 3c. The charge-transfer coefficient ( $\alpha$ ) was determined from the slope of the straight line according to eq 1

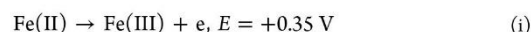
$$\text{slope} = \frac{2.303RT}{(1-\alpha)F} \quad (1)$$

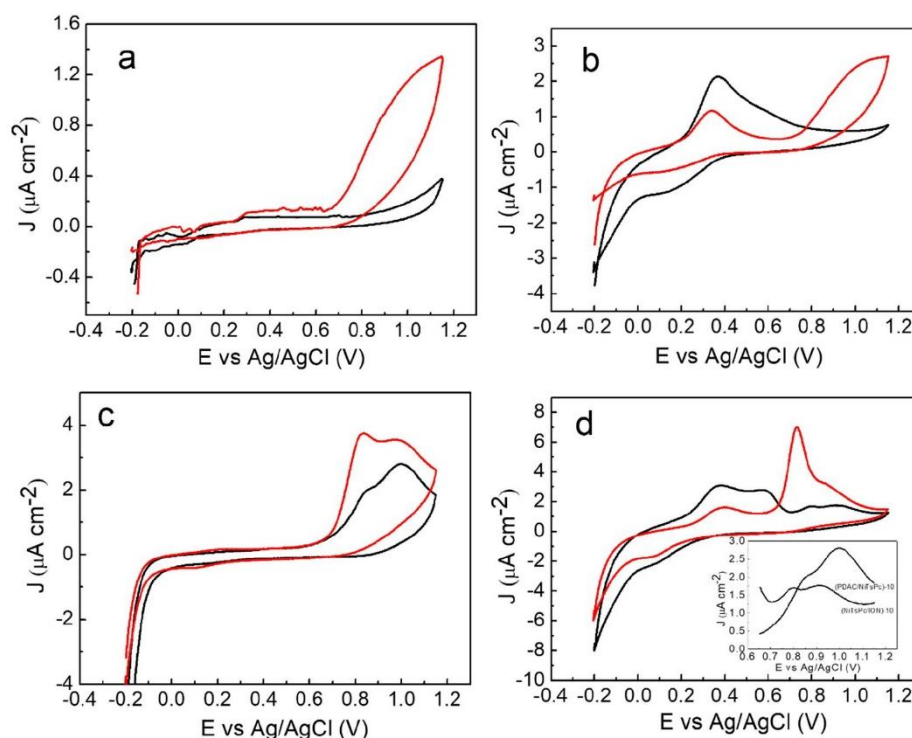
in which  $R = 8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $T = 298.15 \text{ K}$ , and  $F = 96500 \text{ C mol}^{-1}$ . The value found was 0.973, which suggests that the activated complex and oxidized species are quite similar.<sup>53</sup> Afterward, the straight line that describes the dependence between the anodic overpotential ( $E_{pa}$ ) and the logarithm of the scan rate ( $\ln v$ , Figure 3d) was fitted with Laviron's equation (eq 2),<sup>54</sup>

$$E_{pa} = E^0 + \left[ \frac{RT}{2\alpha nF} \right] \ln v \quad (2)$$

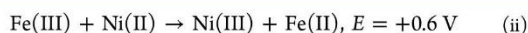
The slope of the straight line is equal to  $[RT/2\alpha nF]$ . Once  $\alpha$  is known,  $n$  is calculated. The value was found to be 1.

It is proposed that the charge-transfer processes within the (NiTsPc/ION) film occur according to the following semi-reactions:

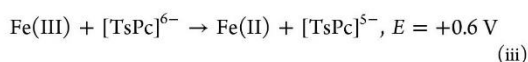




**Figure 4.** Cyclic voltammograms registered in the absence (black line) and presence (red line) of EE2 at  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  and electrolyte  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  sodium acetate buffer (pH 4.5) at a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  scan rate with the following electrodes: (a) bare ITO, (b) (PSS/ION)-10, (c) (PDAC/NiTsPc)-10, and (d) (NiTsPc/ION)-10. The inset in (d) shows the NiTsPc peaks for electrodes with and without ION while being registered in the absence of EE2.



or

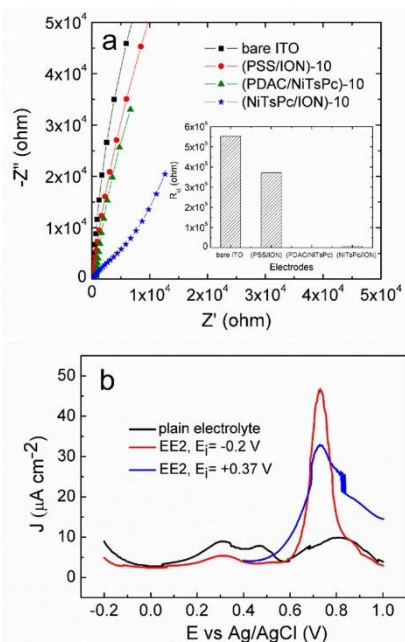


In semireaction (i), Fe(II) in the surface oxyhydroxide species is oxidized to Fe(III), whereas the electron is transferred to the electrode through NiTsPc. In semireaction (ii), Fe(III) is reduced to Fe(II) by Ni(II) from NiTsPc, which thus gets oxidized to Ni(III). Since just part of the NiTsPc molecules are bonded to ION through the oxo bridge, in the other ones, which are bonded to ION by electrostatic interaction through  $-\text{SO}_3^-$  groups, the  $\text{Ni(II)} \rightarrow \text{Ni(III)}$  reaction occurs when its oxidation potential is reached at about +1.0 V. Similarly, in those IONs bonded to NiTsPc by electrostatic interaction,  $\text{Fe(III)} \rightarrow \text{Fe(II)}$  occurs at a reduction potential of +0.19 V. The redox reaction between Fe(III) and TsPc is also possible and is represented by step (iii), in the same potential as step (ii) occurs.

**Roles of NiTsPc and ION in the Electrooxidation of Ethinyl Estradiol.** The supramolecular structure formed by NiTsPc and ION was found to be indispensable to the effective electrooxidation of EE2, as will be shown now. In order to address the roles played by each material in this process as well as their synergistic effect, ITO substrates were also modified with LbL films of NiTsPc and ION assembled separately with nonelectroactive polyelectrolytes. This strategy

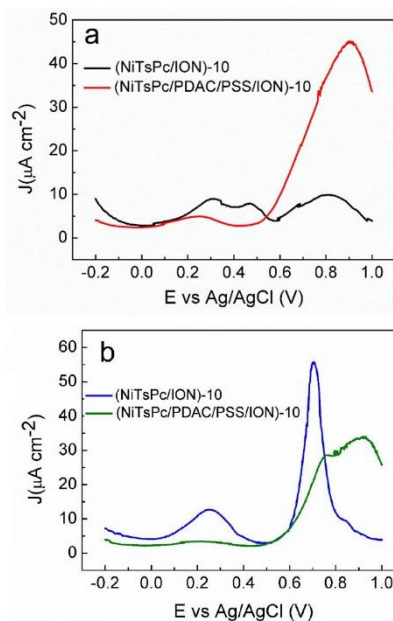
ensures that the observed electrochemical behavior is due to only NiTsPc and ION. Thus, besides (NiTsPc/ION)-10, (PSS/ION)-10 and (PDAC/NiTsPc)-10 modified electrodes were also used to investigate the electrooxidation of EE2.

Figure 4 shows CV registered with different modified electrodes at  $10 \text{ mV s}^{-1}$  in sodium acetate buffer at pH 4.5 in the absence and presence of EE2 ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), as indicated. With bare ITO (Figure 4a), there is no visible electrochemical event in the plain electrolyte, whereas in the presence of EE2 there is an anodic wave starting at +0.7 V, which despite the absence of a defined peak is ascribed to the EE2 oxidation. For the (PSS/ION)-10 electrode (Figure 4b), the CV registered solely in the electrolyte shows a pair of redox peaks (I, +0.35 V; II, +0.19 V), which are assigned to the oxidation–reduction of iron oxyhydroxide surface groups at ION, as reported by Santos et al.<sup>55</sup> In the presence of EE2, these peaks still appear but with lower currents, probably because of the interaction of ION with EE2 molecules. In addition, the EE2 oxidation is detected by a poorly defined anodic wave starting at +0.7 V. When the (PDAC/NiTsPc)-10 modified electrode is employed (Figure 4c), the CV acquired in the plain electrolyte shows two oxidation peaks (III, +0.83 V; IV, +1.0 V), which in accordance with the literature refer to, respectively,  $[\text{TsPc}]^{6-}/[\text{TsPc}]^{5-}$  and  $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$  oxidation reactions occurring in NiTsPc molecules.<sup>52</sup> Surprisingly, the reduction was not detected, even though previous contributions have observed the reduction as well. The main difference herein is the use of a much stronger polyelectrolyte (PDAC) in contrast to poly-



**Figure 5.** (a) Nyquist plots for EE2 oxidation carried out with bare ITO, (PSS/ION)-10, (PDAC/NiTsPc)-10, and (NiTsPc/ION)-10. The inset shows the charge-transfer resistance ( $R_{ct}$ ) determined with each electrode. (b) DPV curves acquired with (NiTsPc/ION)-10 and registered at different initial potentials ( $E_i$ ),  $-0.2$  V and  $+0.37$  V, pulse amplitude  $50$  mV, and scan rate  $10$  mV  $s^{-1}$ . All experiments were carried out with EE2 at  $50$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  and electrolyte sodium acetate buffer ( $0.1$  mol  $L^{-1}$ , pH  $4.5$ ).

(allylamine hydrochloride) and chitosan that have been reported in refs 43 and 52. Still in Figure 4c, in the presence of EE2, former peaks III and IV become larger. The enlargement is greater for peak III because it represents a contribution of both  $[\text{TsPc}]^{6-}/[\text{TsPc}]^{5-}$  and EE2 oxidation reactions. The TsPc ring, when oxidized in this previous step, is capable of stabilizing the  $\text{Ni}^{3+}$  species much better when the electron density is replenished by the electrons transferred by EE2. That is why peak IV also increases. In summary, IONs alone are capable of oxidizing EE2 even though a well-defined anodic peak is not observed whereas NiTsPc alone also show similar ability, but the EE2 oxidation peak appears overlapped with the anodic oxidation of the TsPc ring. Considering sensor applications, these responses are not the best ones. Comparatively, the (NiTsPc/ION)-10 electrode shows a much better efficiency in the oxidation of EE2. As seen in Figure 4d, in the presence of EE2, the CV shows a clearly defined peak at  $+0.73$  V for the EE2 oxidation, which occurs about  $100$  mV lower than in the other previous electrodes. All other electrochemical events from individual IONs and NiTsPc are also present. Nonetheless, they occur far away (ION, peaks I and II) from or they are completely superimposed (NiTsPc, peaks III and IV) by the EE2 oxidation. It is worth mentioning that the  $[\text{TsPc}]^{6-}/[\text{TsPc}]^{5-}$  and  $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$  oxidation reactions are impaired in the presence of ION, as shown by the CV registered in the absence of EE2 (Figure 4d). Although they are somehow catalyzed by ION, since the peaks appear at lower potentials

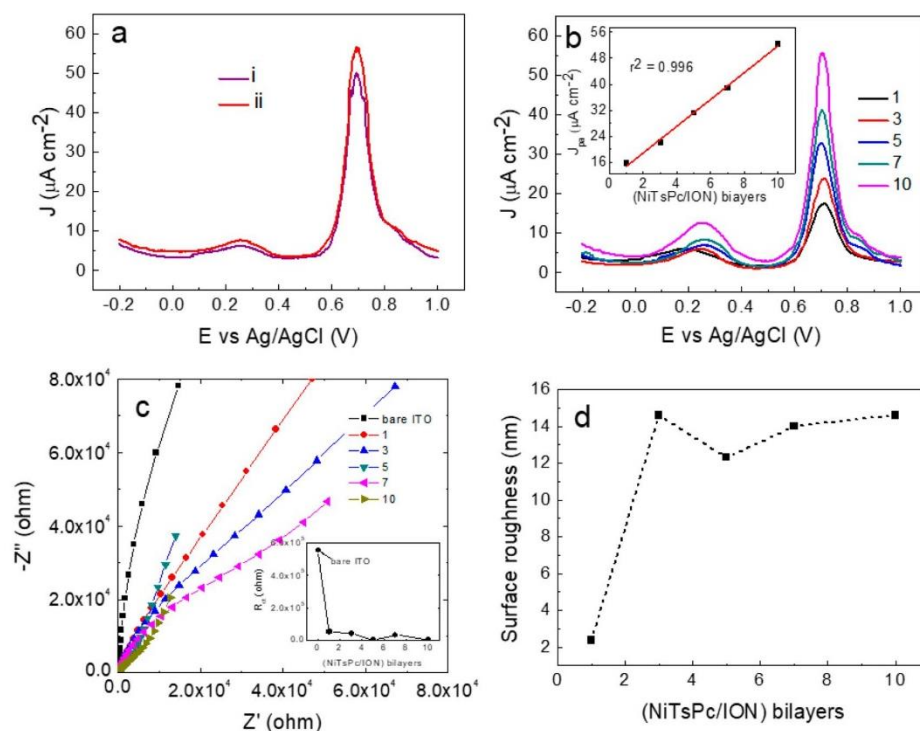


**Figure 6.** DPV curves acquired with (NiTsPc/ION)-10 and (NiTsPc/PDAC/PSS/ION)-10 electrodes in (a) plain electrolyte (sodium acetate buffer,  $0.1$  mol  $L^{-1}$ , pH  $4.5$ ) and (b) EE2 at  $50$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ . All experiments were carried out with a pulse amplitude of  $50$  mV and a scan rate of  $10$  mV  $s^{-1}$ .

( $47$  mV lower for  $[\text{TsPc}]^{6-}/[\text{TsPc}]^{5-}$  and  $69$  mV lower for  $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ ) as shown in the inset, the respective currents are diminished. Moreover, an additional oxidation peak (peak V) appears between the oxidation of ION and TsPc. This peak, as investigated in the previous section, is assigned to a charge-transfer complex formed between ION and NiTsPc, which was made possible by the  $\text{Fe(III)}-\text{O}-\text{Ni(II)}$  bridge previously detected by UV-vis and Raman spectroscopies (Figure 1) as well as by the direct interaction between  $\text{Fe(III)}$  and TsPc.

It is evident that the interaction between NiTsPc and ION by means of charge-transfer was essential to the proper oxidation of EE2 since they alone were not capable of performing that task very efficiently. However, the roles played by each material are still not clear. A set of DPV and EIS experiments have thus been carried out in order to elucidate that point.

Figure 5a shows the EIS spectra (Nyquist plots) registered in the presence of EE2 with the different electrodes. The charge-transfer resistance ( $R_{ct}$ ) for the electrooxidation of EE2 was obtained after fitting the experimental data with an equivalent Randle's circuit model. The convergence criteria for data adjustment was based on the  $\chi^2$  value being equal to or less than  $0.001$ . As shown by the inset,  $R_{ct}$  decreases upon modification of the ITO electrode as follows:  $5.5 \times 10^5$   $\Omega$  (bare ITO),  $3.7 \times 10^5$   $\Omega$  ((PSS/ION)-10),  $5.6 \times 10^2$   $\Omega$  ((PDAC/NiTsPc)-10), and  $5.1 \times 10^3$   $\Omega$  ((NiTsPc/ION)-10). Figure 5b shows DPV curves acquired only with the (NiTsPc/ION)-10 electrode, in the plain electrolyte and in the presence of EE2, starting with the electrode polarization at two different potentials ( $E_i$ ), well before ( $-0.2$  V) and right after ( $+0.37$  V) the ION oxidation. It is seen that when the electrode



**Figure 7.** DPV curves of EE2  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  in sodium acetate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4.5) registered with (a) (NiTsPc/ION)-10 electrodes terminated by (i) NiTsPc and (ii) ION and (b) electrodes made with an increasing number of (NiTsPc/ION) bilayers, from 1 to 10. (c) Nyquist plots for EE2 oxidation (cell potential set at +0.7 V) performed with electrodes containing 1 to 10 (NiTsPc/ION) bilayers. The inset shows the charge-transfer resistance ( $R_{ct}$ ) versus the number of bilayers. (d) Dependence of the film's surface roughness on the number of bilayers.

polarization starts well before the ION oxidation the charge-transfer between ION and NiTsPc is made possible (at +0.5 V) and the EE2 oxidation efficiently occurs, while providing a superior anodic current. In contrast, if the electrode polarization starts at +0.37 V, then ION oxidation is not fully accomplished and the EE2 oxidation occurs at a much lower current. That is why the  $R_{ct}$  determined with the (NiTsPc/ION)-10 electrode is greater than that of (PDAC/NiTsPc)-10 because in the EIS experiment the cell potential is set at +0.7 V.

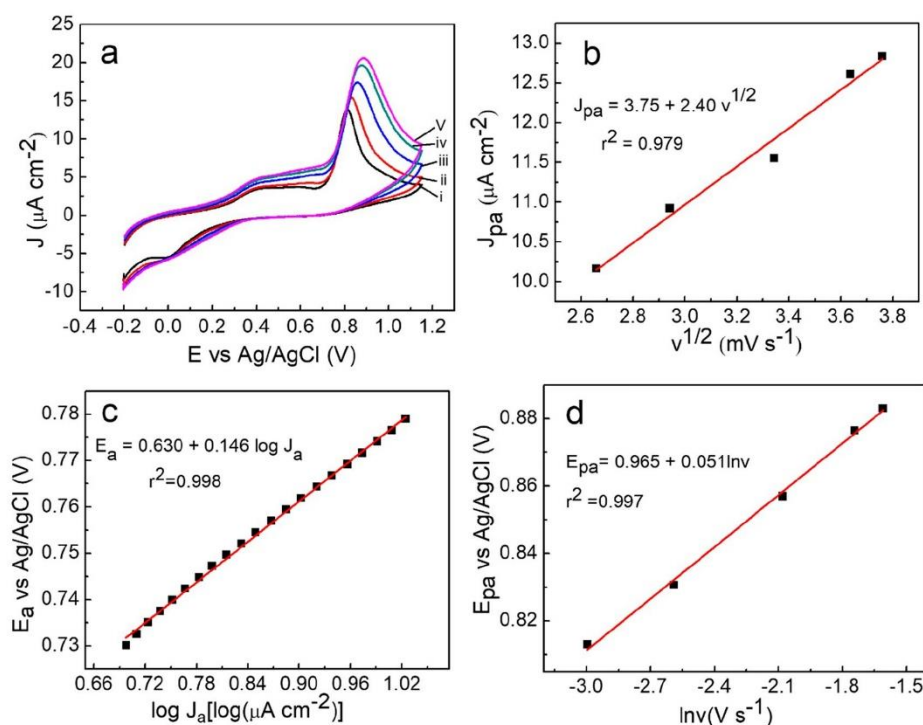
Figure 6 shows a comparison of DPV curves registered in the plain electrolyte (Figure 6a) and in the presence of EE2 (Figure 6b) using the (NiTsPc/ION)-10 and (NiTsPc/PDAC/PSS/ION)-10 electrodes. The second electrode contains a (PDAC/PSS) bilayer in between NiTsPc and ION layers. In the plain electrolyte (Figure 6a), it is seen that, with the introduction of a PDAC/PSS bilayer, ION and NiTsPc are still oxidized but the charge transfer between them is not detected. Although the thickness of a PDAC/PSS bilayer is below 5 nm,<sup>56</sup> it is sufficiently thick to prevent the establishment of the oxo bridge and the charge-transfer between ION and NiTsPc. Consequently, the electrode containing PDAC/PSS bilayers cannot oxidize EE2 (Figure 6b).

Figure 7 shows DPV curves registered in the presence of EE2 using two types of (NiTsPc/ION)-10 electrodes, one terminated by ION and the other terminated by NiTsPc (Figure 7a) and with different numbers of (NiTsPc/ION)

bilayers (Figure 7b). From Figure 7a, it is evident that, with the electrode terminated by ION, the EE2 oxidation is about 15% more efficient. For this electrode architecture, the EE2 oxidation current (for a fixed EE2 concentration) increases linearly with the number of (NiTsPc/ION) bilayers, as shown in Figure 7b. The EIS spectra (Nyquist plots) displayed in Figure 7c support the beneficial effect on the electrooxidation of EE2 when more (NiTsPc/ION) bilayers are deposited. All data were fitted by using an equivalent Randle's circuit, and the convergence criteria for data adjustment were based on the  $\chi^2$  value being equal to or less than 0.001. The inserted graphic shows that  $R_{ct}$  drops steeply right after the deposition of the first bilayer and remains more or less constant afterward. For bare ITO,  $R_{ct} = 5.5 \times 10^5 \Omega$ , whereas for (NiTsPc/ION)-10, it is  $5.5 \times 10^4 \Omega$ . The lowest  $R_{ct}$  value ( $= 3.3 \times 10^3 \Omega$ ) was achieved with five bilayers. It is worth mentioning that this asymptotic trend is similar (with inverse signal) to that observed with the electrode's surface roughness measured by AFM, as shown in Figure 7d. This behavior is typical of a porous electrode, which was confirmed by the SEM and AFM images shown in Figure 2.

**Kinetics of the Electrochemical Oxidation of EE2 with the (NiTsPc/ION) Electrode.** The kinetics of the electrochemical oxidation of EE2 with the (NiTsPc/ION)-10 electrode were investigated by CV performed at different scan rates. This number of bilayers was chosen because films with fewer bilayers would not last as long since IONs are gradually corroded after successive potential scans. The results





**Figure 8.** (a) Cyclic voltammograms of EE2  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  in sodium acetate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4.5) performed with the (NiTsPc/ION)-10 electrode at different scan rates: (i) 50, (ii) 75, (iii) 125, (iv) 175, and (v)  $200 \text{ mV s}^{-1}$ . (b) Dependence of the oxidation current density ( $J_{pa}$ ) on the square root of the scan rate. (c) Tafel's plot for the EE2 oxidation at  $25 \text{ mV s}^{-1}$ . (d) Dependence of the peak potential ( $E_{pa}$ ) on  $\ln v$ .

are shown in Figure 8. The CV curves shown in Figure 8a demonstrate that EE2 electrooxidation is an irreversible process since the reduction reaction in the cathodic scan is not seen. Moreover, the oxidation peak is systematically shifted toward higher potentials, which is also indicative of irreversibility. These findings are in agreement with the literature.<sup>57–60</sup> The oxidation current density was plotted against both the scan rate (not shown) and the square root of the scan rate (Figure 8b). The dependence of the current density on both variables was given by a straight line with identical determination coefficients ( $r^2 = 0.979$ ), thereby suggesting an electrochemical process simultaneously driven by charge transfer and diffusion. From the Tafel plot displayed in Figure 8c, the charge-transfer coefficient was determined according eq 1 and the value found was 0.59. This value suggests that the electronic structure of the transition state retains a great similarity between the oxidized and reduced EE2 species.<sup>53</sup> The number of electrons was determined by fitting with eq 2 the straight line of the graphic shown in Figure 8d. The number of electrons was 2.

EE2 belongs to the family of steroids, and its molecule, whose structural formula is provided in Scheme 1b, shows a  $pK_a$  of 10.46, as determined by UV–vis spectroscopy.<sup>61</sup> The electrooxidation of EE2 occurs via the electrochemical–chemical–electrochemical–chemical (EC–EC) mechanism, in which its molecule loses two electrons and two protons.<sup>62</sup> This mechanism is compatible with the number of electrons and protons determined by cyclic voltammetry as shown in Figure 8.

From an electrochemistry point of view, MPc are recognized for their outstanding electrocatalytic activity.<sup>26</sup> Owing to its conjugated electronic structure, the Pc macrocycle is capable of stabilizing higher valence states of the central metallic ion, which thus conducts the electrooxidation of the targeted substrate at much lower overpotentials. On the other hand, MPc is considered to be a good semiconductor, showing at room temperature an electronic mobility of about  $0.001 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (CuPc).<sup>63</sup> Thus, NiTsPc in the (PDAC/NiTsPc)-10 electrode worked simultaneously as electrocatalysts and charge conductors. Despite that, the CV provided in Figure 4c showed that the (PDAC/NiTsPc)-10 electrode was not capable of providing a single separated peak for the EE2 oxidation; instead, the presence of EE2 was perceived by the enlargement of [TsPc]<sup>6–</sup> and Ni(II) oxidation peaks (peaks III and IV), which in terms of sensor applications is not an ideal response. However, the CV curve displayed in Figure 4d showed that in the presence of ION the oxidation of EE2 resulted in a single well-resolved peak, whereas the interference of [TsPc]<sup>6–</sup> and Ni(II) oxidation peaks was mitigated. The oxidation of EE2 effectively occurred when the ION phase was sufficiently oxidized (Figure 5b) provided that the path between ION and NiTsPc was not blocked by the nonelectroactive (PDAC/PSS) bilayer (Figure 6b). The importance of ION for EE2 electrooxidation performed with the (NiTsPc/ION) electrode was demonstrated further in Figure 7. The highest current density was achieved with the electrode terminated with an ION layer (Figure 7a), which provided a porous and enlarged surface area (Figures 2 and 7d). It is thus concluded that

whereas ION is responsible for adsorbing and oxidizing EE2 ( $\text{Fe(III)} + \text{EE2} \rightarrow \text{Fe(II)} + \text{EE2}^{\cdot}$ ), the ION-NiTsPc charge-transfer complex conducts electrons through the supramolecular film until reaching the ITO substrate.

## CONCLUSIONS

The combination of anionic nickel(II) tetrasulfonated phthalocyanine and positively charged iron oxide nanoparticles into a supramolecular (NiTsPc/ION) film was proven to properly conduct the electrocatalytic oxidation of ethinyl estradiol (EE2). Alone, ION and NiTsPc were capable of oxidizing EE2, although without displaying a defined oxidation peak. In contrast, when these materials were used together in a single electrode, the EE2 oxidation was accompanied by a sharp and separated peak, with a much higher current. In the supramolecular film, the EE2 adsorption/oxidation and charge transport processes are separately carried out by ION and NiTsPc, respectively, thereby improving the electrochemical performance of the modified electrode. As a pivotal role, the charge-transfer complex formed between ION and NiTsPc permitted much faster charge transport across the film. According to UV-vis and Raman spectroscopies, this species was mainly formed by Fe(III)-O-Ni(II) bridges.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.0c04796>.

X-ray diffractogram, TEM image, and size distribution of the ION sample (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Leonardo G. Paterno – Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais, Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70910-900, DF, Brazil; [orcid.org/0000-0001-7716-0318](https://orcid.org/0000-0001-7716-0318); Email: [lpaterno@umb.br](mailto:lpaterno@umb.br)

### Authors

Camila de L. Ribeiro – Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70910-900, DF, Brazil

Jurandir Rodrigues de Souza – Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70910-900, DF, Brazil

Marcelo A. Pereira-da-Silva – Instituto de Física de São Carlos, IFSC, Universidade de São Paulo, 13560-9700 São Carlos, SP, Brazil; Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, 13563-470 São Carlos, SP, Brazil; [orcid.org/0000-0002-1797-4262](https://orcid.org/0000-0002-1797-4262)

Vianney O. Santos, Jr. – Centro de Pesquisas e Análises Tecnológicas (CPT), Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), 70830-902, DF, Brazil

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.0c04796>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) (process no. 0193.000829/2015), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) (process no. 01/13/0470/00) is greatly acknowledged. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) (Finance Code 001).

## REFERENCES

- Schwertmann, U.; Cornell, R. M. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*; VCH Publishers: New York, 1991.
- Bibes, M.; Barthelemy, A. Oxide Spintronics. *IEEE Trans. Electron Devices* **2007**, *54* (5), 1003–1023.
- Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26* (18), 3995–4021.
- Lee, W.; Kim, D.; Lee, S.; Park, J.; Oh, S.; Kim, G.; Lim, J.; Kim, J. Stimuli-Responsive Switchable Organic-Inorganic Nanocomposite Materials. *Nano Today* **2018**, *23*, 97–123.
- Zhang, X. X.; Sun, L. Y.; Yu, Y. R.; Zhao, Y. J. Flexible Ferrofluids: Design and Applications. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1903497.
- Das, P.; Colombo, M.; Prosperi, D. Recent Advances in Magnetic Fluid Hyperthermia for Cancer Therapy. *Colloids Surf., B* **2019**, *174*, 42–55.
- Dadfar, S. M.; Roemhild, K.; Drude, N. I.; von Stillfried, S.; Knuchel, R.; Kiessling, F.; Lammers, T. Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2019**, *138*, 302–325.
- Yang, Z. C.; Qian, J. S.; Yu, A. Q.; Pan, B. C. Singlet Oxygen Mediated Iron-Based Fenton-Like Catalysis Under Nanoconfinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 6659–6664.
- Yu, S. J.; Ng, V. M. H.; Wang, F. J.; Xiao, Z. H.; Li, C. Y.; Kong, L. B.; Que, W. X.; Zhou, K. Synthesis and Application of Iron-Based Nanomaterials as Anodes of Lithium-Ion Batteries and Supercapacitors. *J. Mater. Chem. A* **2018**, *6* (20), 9332–9367.
- Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; de la Guardia, M. Iron and Iron-Oxide Magnetic Nanoparticles as Signal-Amplification Elements in Electrochemical Biosensing. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2015**, *72*, 1–9.
- Kefeni, K. K.; Msagati, T. A. M.; Mamba, B. B. Ferrite Nanoparticles: Synthesis, Characterisation and Applications in Electronic Device. *Mater. Sci. Eng., B* **2017**, *215*, 37–55.
- George, J. M.; Antony, A.; Mathew, B. Metal Oxide Nanoparticles in Electrochemical Sensing and Biosensing: A Review. *Microchim. Acta* **2018**, *185*, 358.
- Cummings, C. Y.; Bonn e, M. J.; Edler, K. J.; Helton, M.; McKee, A.; Marken, F. Direct Reversible Voltammetry and Electrocatalysis with Surface-Stabilised Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Redox States. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 1773–1776.
- Adekunle, A. S.; Ozoemena, K. I. Voltammetric and Impedimetric Properties of Nano-Scaled  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Catalysts Supported on Multi-Walled Carbon Nanotubes: Catalytic Detection of Dopamine. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2010**, *5*, 1726–1742.
- Adekunle, A. S.; Agboola, B. O.; Pillay, J.; Ozoemena, K. I. Electrocatalytic Detection of Dopamine at Single-Walled Carbon Nanotubes-Iron (III) Oxide Nanoparticles Platform. *Sens. Actuators, B* **2010**, *148*, 93–102.
- Bano, K.; Bajwa, S. Z.; Ihsan, A.; Hussain, I.; Jameel, N.; Rehman, A.; Taj, A.; Younus, S.; Iqbal, M. Z. Synthesis of SPIONs-CNT Based Novel Nanocomposite for Effective Amperometric Sensing of First-Line Antituberculosis Drug Rifampicin. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2020**, *20*, 2130–2137.
- Rodríguez, B. A. G.; Pérez-Caro, M.; Alencar, R. S.; Souza Filho, A. G.; Albino Aguiar, J. Graphene Nanoribbons and Iron Oxide Nanoparticles Composite as a Potential Candidate in DNA Sensing Applications. *J. Appl. Phys.* **2020**, *127*, No. 044901.
- Ye, Y.; Mao, S.; He, S.; Xu, X.; Cao, X.; Wei, Z.; Gunasekaran, S. Ultrasensitive Electrochemical Genosensor for Detection of CaMV3SS Gene with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au@Ag Nanoprobe. *Talanta* **2020**, *206*, 120205.

- (19) Nouri, M.; Rahimnejad, M.; Najafpour, G.; Akbar Moghadamnia, A. A *Gr/α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Carbon Paste Electrode Developed as an Electrochemical Sensor for Determination of Rizatriptan Benzoate: An Antimigraine Drug*. *Chemistry Select* **2019**, *4*, 13421–13426.
- (20) Sebastian, N.; Yu, W. C.; Hu, Y. C.; Balram, D.; Yu, Y. H. Sonochemical Synthesis of Iron-Graphene Oxide/Honeycomb-like ZnO Ternary Nanohybrids for Sensitive Electrochemical Detection of Antipsychotic Drug Chlorpromazine. *Ultrason. Sonochem.* **2019**, *59*, 104696.
- (21) Sriram, B.; Govindasamy, M.; Wang, S. F.; Jothi Ramalingam, R.; Al-lohedan, H.; Maiyalagan, T. Novel Sonochemical Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanospheres Decorated on Highly Active Reduced Graphene Oxide Nanosheets for Sensitive Detection of Uric Acid in Biological Samples. *Ultrason. Sonochem.* **2019**, *58*, 104618.
- (22) Ribeiro, C. de L.; Santos, J. G. M.; de Souza, J. R.; Pereira-da-Silva, M. A.; Paterno, L. G. Electrochemical Oxidation of Salicylic Acid at ITO Substrates Modified with Layer-by-Layer Films of Carbon Nanotubes and Iron Oxide Nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.* **2017**, *805*, 53–59.
- (23) Ribeiro, C. de L.; Santos, J. G. M.; Souza, J. R.; Paterno, L. G. Highly Sensitive Determination of Salicylic Acid in Skin Care Product by Means of Carbon Nanotube/Iron Oxide Nanoparticle Voltammetric Sensors. *J. Solid State Electrochem.* **2019**, *23*, 783–793.
- (24) Mphuthi, N. G.; Adekunle, A. S.; Ebenso, E. E. Electrocatalytic Oxidation of Epinephrine and Norepinephrine at Metal Oxide Doped Phthalocyanine/MWCNT Composite Sensor. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26938.
- (25) Mphuthi, N. G.; Adekunle, A. S.; Fayemi, O. E.; Olasunkanmi, L. O.; Ebenso, E. E. Phthalocyanine Doped Metal Oxide Nanoparticles on Multiwalled Carbon Nanotubes Platform for the Detection of Dopamine. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43181.
- (26) Zagal, J. H.; Griveau, S.; Silva, J. F.; Nyokong, T.; Bedioui, F. Metallophthalocyanine-Based Molecular Materials as Catalysts for Electrochemical Reactions. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2755–2791.
- (27) Cheng, Y.; Liang, J.; Veder, J. P.; Li, M.; Chen, S.; Pan, J.; Song, L.; Cheng, H. M.; Liu, C.; Jiang, S. P. Iron Oxide Nanoclusters Incorporated into Iron Phthalocyanine as Highly Active Electrocatalysts for the Oxygen Reduction Reaction. *ChemCatChem* **2018**, *10*, 475–483.
- (28) Cheng, Y.; Veder, J. P.; Thomsen, L.; Zhao, S.; Saunders, M.; Demichelis, R.; Liu, C.; De Marco, R.; Jiang, S. P. Electrochemically Substituted Metal Phthalocyanines, e-MPc (M = Co, Ni), as Highly Active and Selective Catalysts for CO<sub>2</sub> Reduction. *J. Mater. Chem. A* **2018**, *6*, 1370–1375.
- (29) Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Cordeiro, M. R.; Constantino, C. J. L.; Moreira, W. C.; Oliveira, O. N. Nanoscale Processing of Polyaniline and Phthalocyanines for Sensing Applications. *Sens. Actuators, B* **2006**, *113*, 809–815.
- (30) Moraes, F. C.; Golinelli, D. L. C.; Mascaro, L. H.; Machado, S. A. S. Determination of Epinephrine in Urine Using Multi-Walled Carbon Nanotube Modified with Cobalt Phthalocyanine in a Paraffin Composite Electrode. *Sens. Actuators, B* **2010**, *148*, 492–497.
- (31) Cui, L.; Pu, T.; Liu, Y.; He, X. Layer-by-Layer Construction of Graphene/Cobalt Phthalocyanine Composite Film on Activated GCE for Application as a Nitrite Sensor. *Electrochim. Acta* **2013**, *88*, 559–564.
- (32) Rodrigues, V. C.; Moraes, M. L.; Soares, J. C.; Soares, A. C.; Sanfelice, R.; Deffune, E.; Oliveira, O. N. Immunosensors Made with Layer-by-Layer Films on Chitosan/Gold Nanoparticle Matrices to Detect d-Dimer as Biomarker for Venous Thromboembolism. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2018**, *91*, 891–896.
- (33) Lin, T.; Shen, Y. Fabricating Electrochemical Aptasensors for Detecting Aflatoxin B1 via Layer-By-Layer Self-Assembly. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *870*, 114247.
- (34) de Lima, L. F.; Pereira, E. A.; Ferreira, M. Electrochemical Sensor for Propylparaben Using Hybrid Layer-By-Layer Films Composed of Gold Nanoparticles, Poly(Ethylene Imine) and Nickel(II) Phthalocyanine Tetrasulfonate. *Sens. Actuators, B* **2020**, *310*, 127893.
- (35) da Cunha, D. L.; da Silva, S. M. C.; Bila, D. M.; Oliveira, J. L. D.; Sarcinelli, P. D.; Larentis, A. L. Regulation of the Synthetic Estrogen 17 Alpha-ethinylestradiol in Water Bodies in Europe, the United States, and Brazil. *Cad. Saúde Pública* **2016**, *32*, No. e00056715.
- (36) Sodré, F. F.; Pescara, I. C.; Montagner, C. C.; Jardim, W. F. Assessing Selected Estrogens and Xenoestrogens in Brazilian Surface Waters by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Microchem. J.* **2010**, *96*, 92–98.
- (37) Tschapek, M.; Wasowski, C. The Wall Effect of Potential for Determining the Iep of Quartz Sand. *Electrochim. Acta* **1986**, *31*, 691–693.
- (38) Goebbert, C.; Nonninger, R.; Aegerter, M. A.; Schmidt, H. Wet Chemical Deposition of ATO and ITO Coatings Using Crystalline Nanoparticles Redispersible in Solutions. *Thin Solid Films* **1999**, *351*, 79–84.
- (39) Ariga, K.; Ahn, E.; Park, M.; Kim, B. S. Layer-by-Layer Assembly: Recent Progress from Layered Assemblies to Layered Nanoarchitectonics. *Chem. - Asian J.* **2019**, *14*, 2553–2566.
- (40) Borges, J.; Mano, J. F. Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8883–8942.
- (41) Snow, A. W. Phthalocyanine Aggregation. In *The Porphyrin Handbook*; Kadish, K. M., Smith, K. M., Guiard, R., Eds.; Elsevier: New York, 2003; Vol. 17, pp 129–176.
- (42) Alencar, W. S.; Crespilho, F. N.; Martins, M. V. A.; Zucolotto, V.; Oliveira, O. N.; Silva, W. C. Synergistic Interaction between Gold Nanoparticles and Nickel Phthalocyanine in Layer-by-Layer (LbL) Films: Evidence of Constitutional Dynamic Chemistry (CDC). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 5086–5091.
- (43) Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Siqueira, J. R.; Carvalho, A. J. F.; Nart, F. C.; Oliveira, O. N. Using Electrochemical Data to Obtain Energy Diagrams from Layer-by-Layer Films from Metallic Phthalocyanines. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2006**, *1*, 151–159.
- (44) de Lucena, N. C.; Miyazaki, C. M.; Shimizu, F. M.; Constantino, C. J.L.; Ferreira, M. Layer-by-Layer Composite Film of Nickel Phthalocyanine and Montmorillonite Clay for Synergistic Effect on Electrochemical Detection of Dopamine. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *436*, 957–966.
- (45) Santos, C. S.; Ferreira, R. T.; Calixto, C. M. F.; Rufino, J. L.; Garcia, J. R.; Fujiwara, S. T.; Wohnrath, K.; Pessoa, C. A. The Influence of Organization of LbL Films Containing a Silsesquioxane Polymer on the Electrochemical Response of Dopamine. *J. Appl. Electrochem.* **2014**, *44*, 1047–1058.
- (46) Isago, H. *Optical Spectra of Phthalocyanines and Related Compounds: A Guide for Beginners*; Springer: Tokyo, 2015.
- (47) Perez, E. F.; Kubota, L. T.; Tanaka, A. A.; De Oliveira Neto, G. Anodic Oxidation of Cysteine Catalysed by Nickel Tetrasulphonated Phthalocyanine Immobilized on Silica Gel Modified with Titanium (IV) Oxide. *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 1665–1673.
- (48) Chen, C.; Ma, Z.; Zhou, S.; Li, T.; Sun, X. Cobalt-Tetracarboxyl-Phthalocyanine — Efficient Catalyst for Dye Degradation. *Catal. Lett.* **2017**, *147*, 2399–2409.
- (49) Silva, J. C. O.; Sousa, M. H.; Tourinho, F. A.; Rubim, J. C. Raman Spectroscopic Investigation of Maghemite Ferrofluids Modified by the Adsorption of Zinc Tetrasulfonated Phthalocyanine. *Langmuir* **2002**, *18*, 5511–5515.
- (50) Lobo, R. F. M.; Pereira-da-Silva, M. A.; Raposo, M.; Faria, R. M.; Oliveira, O. N. In Situ Thickness Measurements of Ultra-Thin Multilayer Polymer Films by Atomic Force Microscopy. *Nanotechnology* **1999**, *10*, 389–393.
- (51) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: New York, 2001.
- (52) Alencar, W. S.; Crespilho, F. N.; Santos, M. R. M. C.; Zucolotto, V.; Oliveira, O. N.; Silva, W. C. Influence of Film Architecture on the Charge-Transfer Reactions of Metallophthalocyanine

cyanine Layer-by-Layer Films. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 12817–12821.

(53) Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*; Oxford University Press Inc.: New York, 1993.

(54) Laviron, E. General Expression of the Linear Potential Sweep Voltammogram in the Case of diffusionless Electrochemical Systems. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1979**, *101*, 19–28.

(55) Santos, J. G. M.; Souza, J. R.; Letti, C. J.; Soler, M. A. G.; Morais, P. C.; Paterno, L. G. Iron Oxide Nanostructured Electrodes for Detection of Copper (II) Ions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 6614–6623.

(56) Elzbiaciak-Wodka, M.; Kolasinska-Sojka, M.; Nowak, P.; Warszynski, P. Comparison of Permeability of Poly(allylamine hydrochloride)/and Poly(diallyldimethylammonium chloride)/Poly(4-styrenesulfonate) Multilayer Films: Linear vs. Exponential Growth. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *738*, 195–202.

(57) Nodehi, M.; Baghayeri, M.; Ansari, R.; Veisi, H. Electrochemical Quantification of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol in Biological Samples Using a Au/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@TA/MWNT/GCE Sensor. *Mater. Chem. Phys.* **2020**, *244*, 122687.

(58) Coelho, M. K. L.; Silva, D. N.; Pereira, A. C. Development of Electrochemical Sensor Based on Carbonaceous and Metal Phthalocyanines Materials for Determination of Ethinyl Estradiol. *Chemosensors* **2019**, *7*, 32.

(59) Prado, T. M.; Cincotto, F. H.; Moraes, F. C.; Machado, S. A. S. Electrochemical Sensor-Based Ruthenium Nanoparticles on Reduced Graphene Oxide for the Simultaneous Determination of Ethinylestradiol and Amoxicillin. *Electroanalysis* **2017**, *29*, 1278–1285.

(60) Pavinatto, A.; Mercante, L. A.; Leandro, C. S.; Mattoso, L. H. C.; Correa, D. S. Layer-by-Layer Assembled Films of Chitosan and Multi-Walled Carbon Nanotubes for the Electrochemical Detection of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *755*, 215–220.

(61) Hurwitz, A. R.; Liu, S. T. Determination of Aqueous Solubility and pK<sub>a</sub> Values of Estrogens. *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 624–627.

(62) Ngundi, M. M.; Sadik, O. A.; Yamaguchi, T.; Suye, S. First Comparative Reaction Mechanisms of  $\beta$ -Estradiol and Selected Environmental Hormones in a Redox Environment. *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 61–67.

(63) Torikai, K.; Oliveira, R. F.; Camargo, D. H. S.; Bufon, C. C. B. Low-Voltage, Flexible, and Self-Encapsulated Ultracompact Organic Thin-Film Transistors Based on Nanomembranes. *Nano Lett.* **2018**, *18*, 5552–5561.

DOI: 10.1002/elan.202060396

# Voltammetric Detection of Ethinylestradiol in Water and Synthetic Urine Samples using a Ni(II) Phthalocyanine/Iron Oxide Nanocomposite Electrode

Camila de L. Ribeiro,<sup>[a]</sup> Jurandir R. de Souza,<sup>[a]</sup> Marcelo A. Pereira-da-Silva,<sup>[b, c]</sup> and Leonardo G. Paterno<sup>\*,[d]</sup>

**Abstract:** A novel nickel phthalocyanine/iron oxide nanoparticle (NiTsPc/ION) nanocomposite electrode is proposed for the voltammetric detection of ethinyl estradiol. The method shows a wide linear range (0.07–30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 > 0.99$ ), sensitivity of 0.308  $\mu\text{A cm}^{-2}/\mu\text{mol L}^{-1}$  and limit of detection of 7.8  $\text{nmol L}^{-1}$  (3.3 Sb/b). Recoveries are above 95 % for quantification in tap and treatment plant

**Keywords:** ethinyl estradiol · iron oxide nanoparticles · phthalocyanine · sensors · voltammetry

water samples and synthetic urine. A single electrode can be used in seven consecutive runs (RSD=2.85 %) and responses of different electrodes vary only 7–9 %. The excellent sensing performance of the proposed sensor is ascribed to its porous morphology and efficient charge-transfer between ION and NiTsPc.

## 1 Introduction

Ethinyl estradiol (EE2) is a member of the second generation of estrogen-derivative compounds [1]. It exhibits great effectiveness in preventing pregnancy and takes part in most of birth control oral pills commercially available nowadays. As side effects, continuous intake of EE2 may increase the risk of blood clots, liver damage and cancer of uterus [1]. Moreover, EE2 exhibits strong endocrine disrupting activity [2]. Since it is not completely metabolized by humans, it is frequently found in the sewage and other water bodies [2]. In fact, a pioneer study has shown the population collapse of fathead minnow fish living in waters that received untreated municipal waste waters containing tiny amounts of biological and synthetic hormones such as EE2 [3]. Other studies have reported that, at concentrations as low as few nanograms per liter, EE2 may induce anomalies in embryos and impair fertility of adult specimens of zebrafish, medaka and betta fish, affect the growth and behavior of African clawed frog, and decrease the progeny of female daphnia [4]. It can, therefore, put aquatic life into a serious risk. Remediation and monitoring actions are highly desirable to mitigate the harmful effects of EE2 to human and aquatic life.

Several analytical methods have been proposed and applied in an effort to monitor or detect EE2 in different water bodies. Among those, it can be highlighted the high-performance liquid and gas chromatography techniques coupled to mass spectrometry [5–7], enzyme-linked immunosorbent assay [8], and spectrophotometry [9]. Despite the high sensitivity and low limit of detection (LOD) displayed by these methods, it is difficult to implement them at remote locations for performing on-site monitoring. Moreover, they are expensive and time-

consuming, and the output data usually demand for interpretation made up by skilled operators. Conversely, electrochemical sensors can offer at the same time high sensitivity, low LOD and rapid response. They are also amenable for on-site monitoring at much lower cost.

The EE2 molecule undergoes a two electron-two proton irreversible oxidation reaction, in the potential window ranging between 0 to 1 V (vs Ag/AgCl) [10,11]. This electrochemical reaction can be carried out in a controlled way by employing working electrodes modified with nanomaterials [12–16]. Nanomaterials are chosen aiming at the enlargement of the surface and electroactive areas, enhancement of the electrocatalytic activity of the bare electrode, which altogether improve the detection performance. A myriad of nanomaterials has been used to elaborate modified electrodes for the electrochemical detection of EE2, including carbon nanotubes (CNT), reduced graphene oxide (RGO), and metal and metal oxide nanoparticles (Au, Ag, Pd, Ru,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [12–16].

[a] C. de L. Ribeiro, J. R. de Souza  
Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 70910-900, Brazil

[b] M. A. Pereira-da-Silva  
Instituto de Física de São Carlos, IFSC, Universidade de São Paulo, 13560-9700, -São Carlos-SP, Brazil

[c] M. A. Pereira-da-Silva  
Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, 13563-470, -São Carlos-SP, Brazil

[d] L. G. Paterno  
Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 70910-900, Brazil  
E-mail: lpaterno@unb.br

Iron oxide nanoparticles (ION), such as magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) are, for several reasons, of great interest for electrode modification aiming at electrochemical sensing. First, because they are endowed with iron oxyhydroxide surface groups that act simultaneously as adsorption and catalytic sites [17,18]. Second, these surface groups are also susceptible to acid-base equilibrium; in acidic medium, they get protonated and form positively-charged particles that remain stable in the colloidal state due to mutual electrostatic repulsions [19]. These suspensions can be directly used for film deposition and surface modification [20]. And, last but not least, they are much cheaper than metallic nanoparticles and can be produced with high control of size and shape following mild synthesis conditions, for example, the alkaline hydrolysis of  $\text{Fe(III)/Fe(II)}$  ions conducted at room temperature [21]. As a drawback, ION show poor electronic conductivity, which may limit their use alone. A second and more electroactive component, such as CNT, RGO, Au nanoparticles, conducting polymers, and phthalocyanines, is demanded to circumvent that limitation.

Herein, it is proposed the voltammetric detection of EE2 in tap water, water from a treatment plant, and synthetic urine samples, using a novel working electrode based on indium-doped tin oxide substrate surface-modified with a nickel phthalocyanine/iron oxide nanoparticle film, ITO/(NiTsPc/ION). Its improved performance is assigned to the porous morphology of the nanocomposite film and the efficient oxidation of EE2 at the ION's surface, which is accompanied by rapid charge-transfer between NiTsPc and ION. Furthermore, ITO/(NiTsPc/ION) is quite stable and can be used for at least seven consecutive runs without decreasing its sensitivity. The structure and morphology of the modified electrodes are fully revealed by UV-Vis spectroscopy and atomic force microscopy (AFM), whereas the electroanalytical performance is evaluated by differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS).

try (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS).

## 2 Experimental

### 2.1 Materials

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , nickel(II) phthalocyanine-tetrasulfonic acid tetrasodium salt (NiTsPc), poly(diallyl dimethylammonium chloride) (PDAC,  $\text{Mw } 450,000 \text{ g mol}^{-1}$ ), poly(sodium-4-styrene sulfonate) (PSS,  $\text{Mw } 70,000 \text{ g mol}^{-1}$ ), and ethinyl estradiol (EE2) 98 %, were all purchased from Sigma-Aldrich (USA) and used without any purification procedure. The structural formulae of all films' components and EE2 are depicted in Figure 1a. All other chemicals were of analytical grade or better and were purchased from Merck (Germany) and Synth (Brazil). Ultrapure water (resistivity: 18 Mohm cm) provided by a Milli-Pore Milli-Q water purification system was used in all experimental procedures unless otherwise stated. Film depositions were performed onto quartz and indium-doped tin oxide (ITO, resistivity: 15 ohm sq) slides (1.0 mm  $\times$  10.0 mm  $\times$  25 mm).

### 2.2 ION Synthesis and Film Depositions

The ION suspension ( $5.0 \text{ g L}^{-1}$ ) was prepared by means of alkaline coprecipitation of a 1:2 mol/mol  $\text{Fe(II)/Fe(III)}$  solution at room temperature, followed by peptization in acidic aqueous medium ( $\text{HClO}_4$ ,  $\text{pH}=4.0$ ) as reported elsewhere [21,22]. This procedure rendered positively-charged ION (zeta potential =  $+46 \pm 1 \text{ mV}$ ) due to protonation of iron oxyhydroxide surface groups. The quartz substrates were first cleaned in "piranha" solution ( $\text{H}_2\text{SO}_4\text{:H}_2\text{O}_2$ , 3:1, v/v) followed by alkaline solution ( $\text{NH}_4\text{OH:H}_2\text{O}_2\text{:H}_2\text{O}$ , 5:1:1, v/v), and stored in ultrapure water afterwards. ITO substrates were soaked in diluted

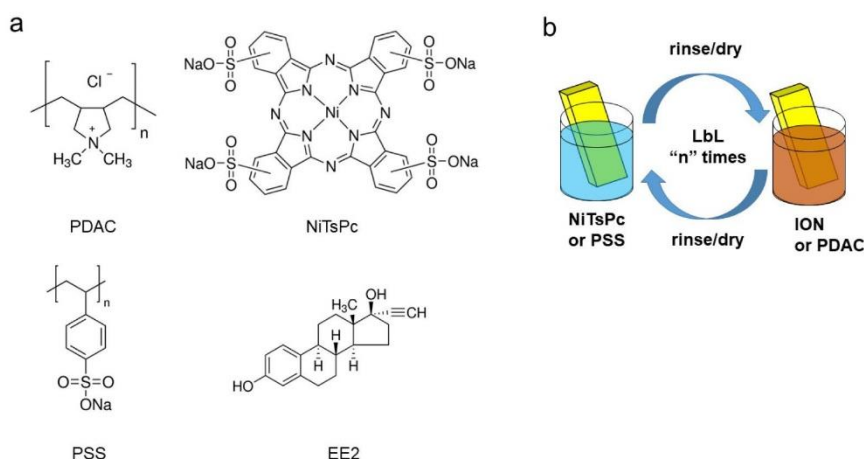


Fig. 1. (a) Structural formulae of PDAC, NiTsPc, PSS, and EE2; (b) schematic view of the layer-by-layer deposition.

## Full Paper

## ELECTROANALYSIS

neutral detergent in ultrasonic bath (80 W) for 20 min., rinsed and stored in ultrapure water as well.

Aqueous PDAC, PSS, and NiTsPc solutions ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=4.0$ ) were prepared by magnetic stirring. The films were deposited onto both quartz and ITO substrates by means of the layer-by-layer technique performed by hand and at room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ), as schematically depicted in Figure 1b. In brief, the substrate was firstly immersed into the cationic solution (PDAC or ION) for 5 min., rinsed in  $\text{HClO}_4$  solution ( $\text{pH}=4$ ) and finally blow dried with compressed air. These procedures were then identically repeated for the deposition of the anionic materials (PSS or NiTsPc). This deposition cycle lead to a cationic/anionic bilayer film and it was successively repeated until the planned number of bilayers. Accordingly, three electrode architectures were fabricated and tested: ITO/(PSS/ION), ITO/(PDAC/NiTsPc) and ITO/(NiTsPc/ION).

### 2.3 Characterization of Samples Structure and Morphology

The crystal structure and morphology of the ION sample was assessed by X-ray diffractometry (Bruker D8 Focus,  $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$  (Cu  $K\alpha$ ),  $0.1^\circ \text{ min}^{-1}$ , resolution  $0.5^\circ$ ), transmission electron microscopy (Jeol Jim 1011, 80 kV) and dynamic light scattering (Malvern Zeta sizer NanoZ590). The electronic structure of solutions and films was determined by UV-Vis spectroscopy (Varian Cary 5000, scan  $0.1 \text{ nm min}^{-1}$ , resolution 1 nm). The film morphology was evaluated by atomic force microscopy (AFM) (Bruker Dimension ICON; silicon tips and cantilever spring constant of  $40 \text{ N m}^{-1}$ ).

### 2.4 Electrochemical Characterizations

The electrochemical experiments were conducted in a three-electrode configuration glass cell (70 mL, Ag/AgCl reference electrode (saturated KCl), Pt wire counter electrode and ITO modified with the nanocomposite as working electrode) using a Metrohm potentiostat/galvanostat (Autolab PGSTAT 204) provided with the FRA 2 module (100 MHz to 0.1 Hz; 10 points per decade, amplitude of 50 mV). All electrochemical data were registered and analyzed with the NOVA 1.11 software. A stock EE2 solution ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) was prepared in absolute ethanol and diluted in appropriate buffer solution afterwards. Initially, the electrode response to EE2 was evaluated by DPV and EIS in order to confirm the electrode modification and estimate the improvement brought by the NiTsPc/ION film. Afterward, the electroanalytical detection of EE2 was carried out by solely by DPV, for which the operational parameters (type and pH of the electrolyte, scan rate, and amplitude) were optimized.

The method's accuracy was evaluated by recovery experiments after spiking standard EE2 into tap water and water sample collected from a water treatment plant

(Paranoá Lake) in Brasília-Brazil. The water samples were filtered through  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  nylon filters and then used to prepare the supporting electrolyte (sodium acetate buffer,  $\text{pH} 4.0$ ), which was spiked with EE2 solutions at 2.0 and  $10.0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ .

A sample of synthetic urine (50 mL) was prepared in ultrapure water according to the composition reported elsewhere [19], as follows: NaCl (0.146 g), KCl (0.08 g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.056 g),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0.112 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.07 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.05 g), and urea (1.25 g). Then, 375  $\mu\text{L}$  of it were added to 25 mL of the supporting electrolyte (sodium acetate buffer,  $\text{pH} 4.0$ ) and doped with EE2 until  $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . The sample was used immediately after its preparation.

## 3 Results and Discussion

### 3.1 Electrode Modification

Figure 2 displays some structural and morphological features of bare ION and (NiTsPc/ION) films deposited onto the quartz substrate. The XRD pattern of bare ION as shown in Figure 2a displays the main diffraction peaks expected for the inversed spinel iron oxide structure [23]. The Scherrer equation as applied to the most intense one, (311), allowed the lattice parameter to be estimated. The value found was  $8.377 \text{ \AA}$ , which is between that of magnetite ( $8.397 \text{ \AA}$ ) and maghemite ( $8.3515 \text{ \AA}$ ), therefore indicating both phases are present in the ION sample. The mean diameter of ION was  $8.72 \pm 0.24 \text{ nm}$  according to the size distribution fitted with a log-normal function, as shown in Figure 2b. The TEM image inserted in Figure 2b reveals a nearly-spherical morphology for ION. UV-Vis spectra of films containing an increasing number  $n$  of (NiTsPc/ION) bilayers, Figure 2c, exhibit the main electronic transitions expected for the individual film's constituents as shown in the inset, or else, the Q-band (610 nm) and the B- or Soret band (334 nm), both assigned to NiTsPc [24,25], whereas the  $\text{O}2\text{p} \rightarrow \text{Fe}4\text{d}$  electron transfer band is structureless and appears as a subtle shoulder at 334 nm [21,22]. Indeed, it looks somehow mixed with the Soret band from NiTsPc. Moreover, it is noticed a blue-shift of the Q-band, when going from the plain NiTsPc solution (624 nm) to the (NiTsPc/ION) film (610 nm). This effect is associated to aggregation of NiTsPc molecules, either with themselves through  $\pi$ -stacking and  $\text{Ni(II)-O-Ni(II)}$  bridges [26], as well as with ION, by means of  $\text{Ni(II)-O-Fe(III)}$  bridges. Figure 2d shows that the film's absorbance measured at 334 nm and 610 nm increases linearly with the number  $n$  of (NiTsPc/ION) bilayers. For each wavelength, the linear fitting equations are as follows:  $\text{abs}(334 \text{ nm})=0.024+0.067n$ ,  $R^2=0.99$ ;  $\text{abs}(610 \text{ nm})=0.097+0.019n$ ,  $R^2=0.99$ , in which  $n$  stands for the number of bilayers. The dependence of the film's thickness (as measured by AFM) on the number of bilayers is also provided in Figure 2d. The error bars represent the standard deviation for measurements performed at three different sample spots. It is seen that the

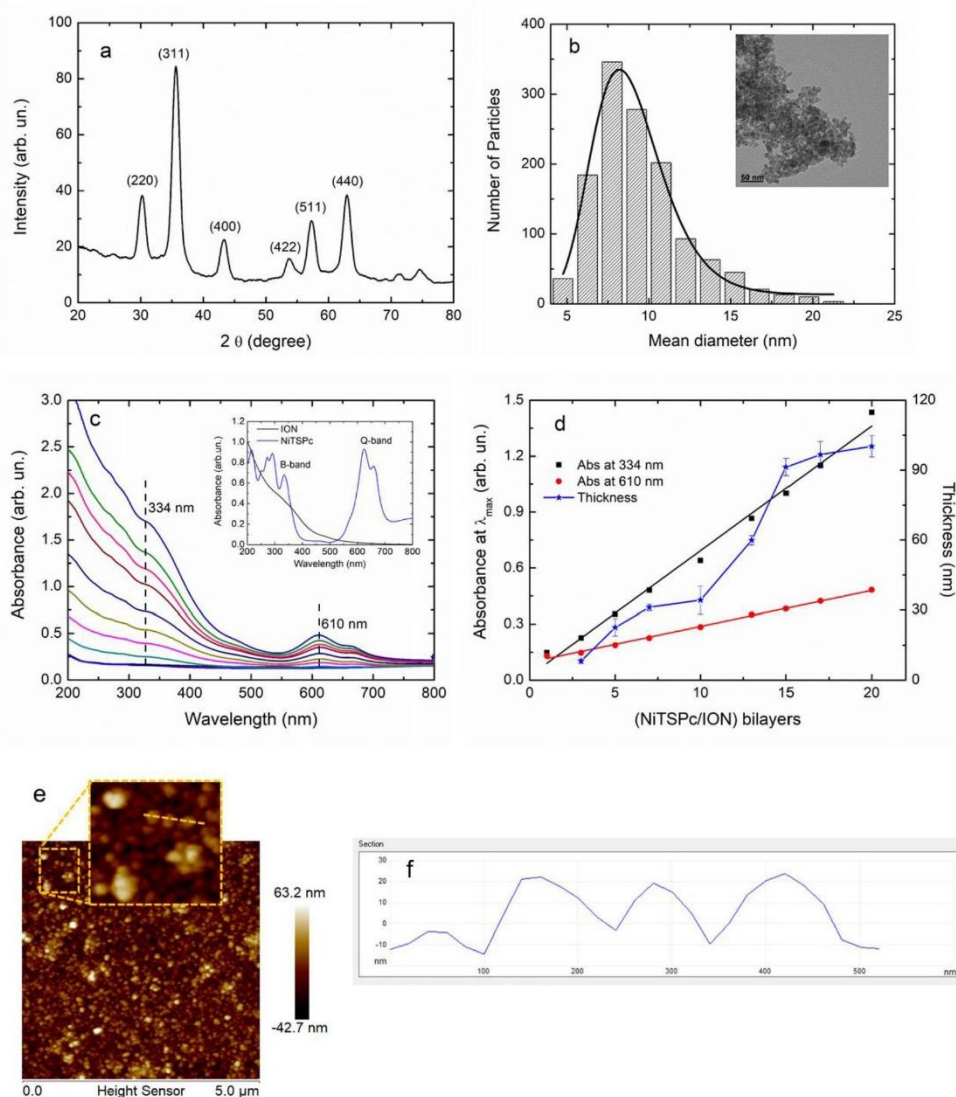


Fig. 2. Structural characteristics of bare ION and (NiTsPc/ION) films: (a) XRD pattern and (b) size distribution of bare ION. The inset in (b) shows a typical TEM image of ION; (c) UV-Vis spectra registered after successive deposition of (NiTsPc/ION) bilayers onto quartz. The inset in (c) shows the UV-Vis spectra of diluted NiTsPc solution and ION suspension; (d) Dependence of film's absorbance (at 334 nm and 610 nm) and thickness on the number of (NiTsPc/ION) bilayers; (e) AFM topography image of the (NiTsPc/ION)-10 sample alongside the (f) surface profile trace as zoomed viewed in (e).

thickness increases with the number of bilayers, but it does not follow the same linearity. Figure 2c displays an AFM image of the (NiTsPc/ION)-10 film, which shows a globular morphology, with porous established in the voids left between spherical ION. This feature is systematically reproduced for all bilayers as reported in Figure S1. Figure 2f shows the surface profile traced across an enlarged view in the AFM image (shown in Figure 2c) and reveals three ION aggregates, each measuring

approximately 20 nm (height) and 130 nm (diameter). These data suggest that the amount of ION and NiTsPc deposited onto the substrate is the same in each bilayer, which is confirmed by the stepwise increase of the film's absorbance. The ION contribute for a porous morphology, with the adsorption of individual and aggregated particles and, therefore, leading to a non-linear increase of the film thickness. Despite that, the proposed method enables one to control the amount of deposited electro-



## Full Paper

## ELECTROANALYSIS

active materials by the number of deposited bilayers, which is desirable for electrode modification.

### 3.2 Electrochemical Behavior of (NiTsPc/ION) Electrodes

Figure 3a shows DPV curves registered in the plain electrolyte (sodium acetate buffer  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=4$ ) and EE2 ( $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), while using bare and modified ITO electrodes: ITO/(NiTsPc/ION)-10, ITO/(PSS/ION)-10, and ITO/(PDAC/NiTsPc)-10. The aim of testing ITO electrodes modified with ION and NiTsPc in separated films is to support the evidence of synergism occurring when those materials are employed in a same film. Whereas bare ITO shows no electroactivity in either plain electrolyte or EE2 solution, DPV curves obtained with the modified electrodes show several peaks, which correspond to the redox reactions occurring with the electrodes' components as well as EE2. The DPV curves registered with the ITO/(PSS/ION)-10 in both plain electrolyte and EE2 exclusively show a single peak at  $+0.234 \text{ V}$ , which is ascribed to the  $\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)}$  conversion at ION's surface groups [21,22]. Therefore, ION alone does not improve the ITO capability of oxidizing EE2. On the other hand, the DPV curve registered with ITO/(PDAC/NiTsPc)-10 in the plain electrolyte shows a large and broad peak centered at  $+0.9 \text{ V}$ , which is assigned to the oxidation of  $\text{Ni(II)}$  to  $\text{Ni(III)}$  in NiTsPc [27,28]. Due to its broad feature, the oxidation of the phthalocyanine ring, which is expected to occur at a lower potential, may be somehow overlapped to it. In the presence of EE2, this peak is decreased about 35 %, but no evidence of EE2 oxidation is noticed. Finally, the DPV curves obtained with the ITO/(NiTsPc/ION)-10 electrode suggest a much different behavior. For example, in the plain electrolyte, the DPV curve shows three peaks

(please refer to the zoomed view): the first one is centered at  $+0.25 \text{ V}$  and it is assigned to the  $\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)}$  conversion at the ION's surface; an intermediary peak, located at  $+0.462 \text{ V}$ ; and a third one, at  $+0.77 \text{ V}$ , which is ascribed to NiTsPc. This intermediary peak at  $+0.462 \text{ V}$  is ascribed to the charge-transfer between  $\text{Fe(III)}$  and NiTsPc, mainly via  $\text{Fe(III)-O-Ni(II)}$  bridges, since the electrochemical signal related to the  $\text{Ni(II)} \rightarrow \text{Ni(III)}$  reaction is suppressed. This hypothesis is supported by UV-Vis spectra of the (NiTsPc/ION) film (Figure 2a), which show a blue-shift of  $14 \text{ nm}$  of the NiTsPc Q-band, therefore suggesting its aggregation with ION. It is even more interesting to note that, in the presence of EE2, the corresponding DPV curve shows solely two peaks; one at lower potential ( $+0.254 \text{ V}$ ), which is assigned as the oxidation of ION, and a second and more prominent one at  $+0.70 \text{ V}$ , which is assigned to the EE2 oxidation.

Figure 3b reports Nyquist plots for the oxidation of EE2 using bare ITO and ITO/(NiTsPc/ION)-10. The spectra were modeled with a modified Randles' circuit shown in supplementary material (Figure S2), in which the Warburg element employed for accounting the diffusion process was replaced by a simple capacitor. Otherwise, data fitting did not converge. Values of the circuit elements are reported in Table S1. It is noticed that the overall impedance is decreased upon deposition of the (NiTsPc/ION)-10 film, which is mainly due to a reduction of the charge-transfer resistance ( $R_c$ ) by two orders of magnitude, from  $5.5 \times 10^5 \text{ ohms}$  (bare ITO) to  $5.1 \times 10^3 \text{ ohms}$  (ITO/(NiTsPc/ION)-10). The additional capacitor,  $C_2$ , represents a blocking insulating layer formed by adsorption of EE2 oxidation products onto the electrode. The adsorption is more pronounced onto the modified ITO, for which  $C_2 = 53.9 \text{ } \mu\text{F}$ , whereas for bare ITO,  $C_2 = 11.2 \text{ } \mu\text{F}$ . The (NiTsPc/ION) film enlarges the electrode's surface area and provides more sites for

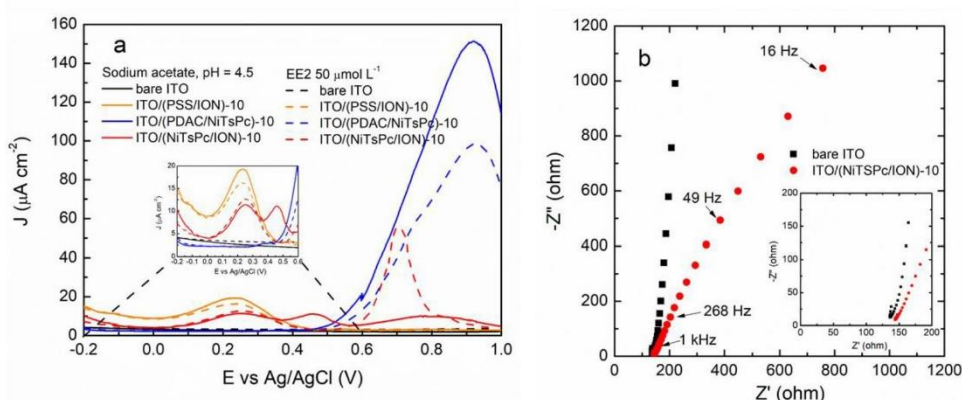


Fig. 3. (a) DPV curves registered with bare and modified ITO electrodes, as indicated, in the plain electrolyte (sodium acetate  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=4$ ) and in the presence of EE2 ( $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ). DPV conditions: scan rate  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ; amplitude  $50 \text{ mV}$ . (b) Nyquist plots for EE2,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  in sodium acetate buffer,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=4.5$ , registered with bare ITO and ITO/(NiTsPc/ION)-10 electrodes. Frequency range:  $100 \text{ MHz}$  to  $0.1 \text{ Hz}$ ; cell potential:  $+0.75 \text{ V}$ .

## Full Paper

## ELECTROANALYSIS

interaction with EE2 and its oxidized subproducts. It is, therefore, demonstrated that the combination of ION and NiTsPc into the same electrode is pivotal for the proper oxidation of EE2.

Since the ITO/(NiTsPc/ION) electrode has proven its suitability for oxidizing EE2, the experimental conditions required for achieving its best performance were then investigated. Figure 4 reports DPV curves for EE2 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) using ITO modified with an increasing number of (NiTsPc/ION) bilayers, as well as the influence of different types of electrolytes and pH, and the necessity of the electrode reconditioning. The results for optimization of other DPV parameters, including reconditioning potential, scan rate and pulse amplitude are shown in Figure S1. Figure 4a shows that the EE2 oxidation current density at the anodic peak ( $+0.77 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ),  $J_{\text{pa}}$ , increases almost linearly until 15 bilayers. This linear increase is typical of a porous electrode. Afterward, the electrode's response decrease, which is associated to an unbalance between number of bilayers and film's resistivity. Considering that the cost for preparing such an electrode is directly proportional to the number of bilayers and that the electrode modified with 10 bilayers already provides a  $J_{\text{pa}}$  of about  $12 \mu\text{A cm}^{-2}$ , the electrode ITO(NiTsPc/ION)-10 has been chosen for the electroanalytical determination of EE2. Indeed, electrodes with

fewer bilayers lasted for a lower number of measurements, and therefore were not considered further. Figure 4b shows the effect of different supporting electrolytes at  $\text{pH}=4$  over  $J_{\text{pa}}$ . It is seen that sodium acetate buffer provides the best condition, although all other tested electrolytes exhibit comparable performances. Figure 4c shows that both,  $J_{\text{pa}}$  and the oxidation peak potential,  $E_{\text{pa}}$ , decrease as the pH is increased between 2 and 6. EE2 pKa is 10.46 [29]. Therefore, in the pH range studied herein, EE2 molecules remain protonated. According to the literature, EE2 oxidation takes place at the phenolic ring, and involves the losses of two electrons and two protons [10,11,27]. By one hand, as the pH is raised near the pKa, the phenol is converted to phenolate and oxidation should be facilitated. Nonetheless, higher pH would also provoke loss of iron from ION in the form of insoluble iron hydroxides. On the other hand, in acidic medium, the EE2 oxidation is favored since it is proposed that the following reaction (equation 1) takes place at the ION's surface, with the EE2 molecule losing one electron and one proton:

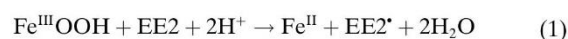


Figure 4d shows three DPV curves registered with the same electrode in different situations. Curve (i) corre-

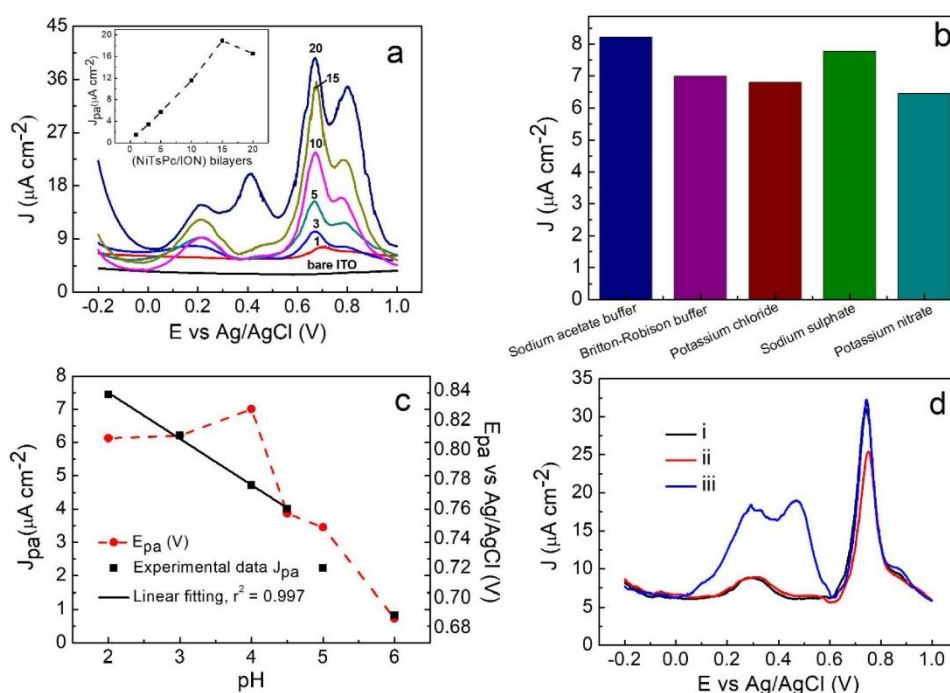


Fig. 4. DPV of EE2 performed with ITO/(NiTsPc/ION) electrodes. Dependence of EE2  $J_{\text{pa}}$  on (a) the number of (NiTsPc/ION) bilayers and (b) the type of supporting electrolyte at  $\text{pH}=4$ ; (c) dependence of  $J_{\text{pa}}$  and  $E_{\text{pa}}$  on the pH using  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  sodium acetate buffer as the supporting electrolyte; and (d) effect of the electrode reconditioning step on the DPV response. In all experiments,  $[\text{EE2}] = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , scan rate:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ; amplitude:  $50 \text{ mV}$ .

## Full Paper

## ELECTROANALYSIS

sponds to the first scan and gives the EE2 oxidation peak at +0.74 V and  $J_{pa}=30.9 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Curve (ii) represents the second scan, run right after the first and without performing any cleaning or reconditioning of the electrode; the oxidation peak occurs in the same potential as in the first scan, but  $J_{pa}$  is 18% lower. Curve (iii) was registered after curves (i) and (ii), but the electrode was submitted to a reconditioning step (static polarization at  $-0.6$  V in the plain electrolyte). Now, it is seen that  $J_{pa}$  is reestablished to the same value achieved in the first scan. In addition, the DPV curve (iii) also shows two other peaks, the first one at +0.29 V, corresponding to oxidation of magnetite to maghemite, and a second one at +0.47 V, which is ascribed to the charge-transfer between Fe(III) and NiTsPc. The decrease of  $J_{pa}$  from curve (i) to curve (ii) is ascribed to EE2 oxidation subproducts that adsorb onto the electrode. They are effectively removed during the reconditioning step, which has been optimized as shown in Figure S1a.

## 3.3 Figures of Merit and Analytical Applications

The electrochemical performance of a single ITO/(NiTsPc/ION)-10 electrode was evaluated after optimizing the experimental conditions (reconditioning of the electrode, scan rate and pulse amplitude), which are reported in Figure S3. As shown in Figure S4,  $J_{pa}$  gradually decreases with the number of scans during eighteen consecutive measurements of EE2 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  sodium acetate buffer,  $\text{pH}=4.0$ ; reconditioning step between each measurement). The relative standard deviation (RSD) of  $J_{pa}$  is 2.85% after seven scans and increases to 11% after eleven scans. The latter RSD is still considered acceptable according to the AOAC recommendations [30]. The reproducibility was evaluated with three identical ITO/(NiTsPc/ION)-10 electrodes fabricated in either the same or different batches. For those fabricated in the same batch, the RSD of  $J_{pa}$  was 6.99%, whereas for those fabricated in different

batches was 9.04%. It is thus concluded that a single ITO/(NiTsPc/ION)-10 electrode can be used for up to eleven consecutive runs and its fabrication process is considered reproducible. This performance is ensured provided that electrodes were individually stored in plastic vials at room temperature and protected from light.

Figure 5 shows DPV curves for increasing concentrations of EE2, from  $0.07$  to  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figure 5a) and from  $10$  to  $46 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figure 5b). The inset of Figure 5a shows two linear ranges; the first, between  $0.07$  and  $3.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , with the respective linear equation:  $J_{pa} (\mu\text{A cm}^{-2}) = 0.024 + 0.308 [\text{EE2}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ,  $R^2 = 0.998$ , and the second, between  $3.3$  and  $11.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , with the linear equation:  $J_{pa} (\mu\text{A cm}^{-2}) = 0.543 + 0.147 [\text{EE2}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ,  $R^2 = 0.998$ . The highest sensitivity is therefore  $0.308 \mu\text{A cm}^{-2}/\mu\text{mol L}^{-1}$ . The presence of two linear ranges is due to partial degradation of the electrode, in which some ION are eroded during successive potential scans and the electrode's electroactive area is diminished. Figure 5b reports DPV curves registered in a wider concentration range, which was intended to observe the saturation region. Indeed, it was observed a single linear range,  $10$ – $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , with equation  $J_{pa} (\mu\text{A cm}^{-2}) = -0.21 + 0.25 [\text{EE2}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ ,  $R^2 = 0.997$ , plus a saturation above  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

The calculated limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) obtained from  $3\text{Sb}/\text{b}$  and  $10\text{Sb}/\text{b}$  ratios [31], respectively, in which  $\text{Sb}$  is the blank standard deviation and  $\text{b}$  is the slope of the calibration curve were  $\text{LOD} = 7.8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  and  $\text{LOQ} = 2.4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Those are theoretical values. For LOD, it is about ten times lower than the lowest measured concentration, which was  $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{s}/\text{n}=3$ ). Both linear range and LOD achieved with the present sensor are comparable to those exhibited by other electrochemical sensor platforms reported in Table 1. Nevertheless, it is worth mentioning that most of the electrodes reported in Table 1 are composed by more expensive materials and, in many instances, do not show the same reproducible performance.

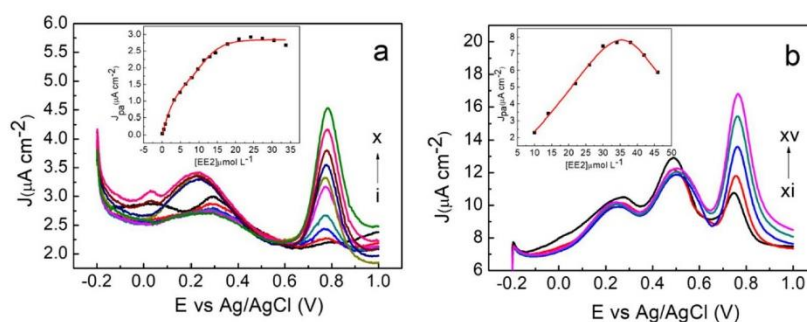


Fig. 5. DPV curves registered with the ITO/(NiTsPc/ION)-10 electrode for EE2 at different concentrations: (a)  $0.07$ ;  $0.5$ ;  $0.9$ ;  $1.7$ ;  $3.3$ ;  $4.9$ ;  $6.5$ ;  $8.1$ ;  $9.7$ ;  $11.3 \mu\text{mol L}^{-1}$  (from i to x) and (b)  $10$ ,  $14$ ,  $22$ ,  $26$  e  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (from xi to xv). Experimental conditions: electrolyte, sodium acetate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH}=4.0$ ); scan rate of  $30 \text{ mV s}^{-1}$  and pulse amplitude of  $50 \text{ mV}$ . Inserted graphics show the variation of  $J_{pa}$  at  $+0.77 \text{ V}$  with the EE2 concentration.

Table 1. Comparison of limit of detection and linear range of different electrodes and methods for the quantification of EE2.

Electrode and time of preparation	Method	Detection limit (mol L <sup>-1</sup> )	Linear range (mol L <sup>-1</sup> )
RGO/SPCE/anti-EE2 [12]	SWV	$3.4 \times 10^{-13}$	$1.7 \times 10^{-13}$ to $4.0 \times 10^{-10}$
Pd/g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -CNTs/GCE [13]	DPV	$5.00 \times 10^{-7}$	$2.0 \times 10^{-6}$ to $1.5 \times 10^{-4}$
HRP-EE2-anti-EE2/AgNPs/SiO <sub>2</sub> /GO/GCE [14]; overnight	Amp	$2.2 \times 10^{-10}$	$3.4 \times 10^{-10}$ to $1.7 \times 10^{-7}$
Au/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @TA/MWNT/GCE [15]	DPV	$3.3 \times 10^{-9}$	$1.0 \times 10^{-8}$ to $1.2 \times 10^{-4}$
GCE/rGO/RuO <sub>2</sub> [16]	DPV	$2.0 \times 10^{-9}$	$5.5 \times 10^{-8}$ to $1.2 \times 10^{-6}$
HMDE [32]	SW-AdSV	$4.95 \times 10^{-8}$	$4.95 \times 10^{-8}$ to $4.9 \times 10^{-7}$
MWCNTs/GCE/MPs/anti-EE2 [33]	SWV	$3.4 \times 10^{-14}$	$1.2 \times 10^{-13}$ to $2.4 \times 10^{-10}$
CPB/CPE [34]	LSV	$3.0 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-8}$ to $2 \times 10^{-5}$
BDD [35]	SWV	$2.4 \times 10^{-7}$	$7.9 \times 10^{-7}$ to $5.2 \times 10^{-6}$
AgNP-SAE-CTAB [36]	SCV	$1.03 \times 10^{-7}$	$6.4 \times 10^{-7}$ to $7.8 \times 10^{-6}$
GCE/MWCNT/CoPc [37]; 2.2 h	SWV	$2.2 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-6}$ to $9 \times 10^{-5}$
Chi/CNTs [38]; 0.65 h	SWV	$9.0 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-8}$ to $2 \times 10^{-5}$
This work; 1 h	DPV	$7.8 \times 10^{-9}$	$7 \times 10^{-8}$ to $3 \times 10^{-5}$

Amp amperometry, CV cyclic voltammetry, DPV differential pulse voltammetry, SWV square wave voltammetry, AdSV adsorptive stripping voltammetry, LSV linear sweep voltammetry, SCV staircase voltammetry, CPE carbon paste electrode, SPCE screen printed carbon electrode.

Table 2. Quantification of EE2 in spiked water samples.

Sample	EE2 (μmol L <sup>-1</sup> )	Added Amount found ± SD [a]	Recovery (%)
Tap water	2	2,13 ± 0,23	106,5
	10	10,96 ± 0,91	109,6
Water treatment plant	2	1,92 ± 0,22	96,2
	10	10,2 ± 0,42	102

[a] Standard deviation of 3 determinations.

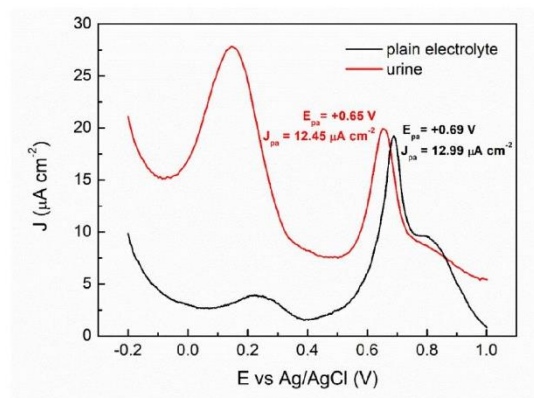


Fig. 6. DPV curves for EE2 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) registered with the ITO/(NiTsPc/ION)-10 electrode in plain electrolyte (sodium acetate buffer) and synthetic urine. DPV conditions: scan rate of  $30 \text{ mV s}^{-1}$  and pulse amplitude of  $50 \text{ mV}$ .

ance as the ITO/(NiTsPc/ION) electrode does. Table 1 also reports the time of preparation of the electrodes, when available.

The matrix effect on the detection of EE2 was evaluated in tap water and water collected from a treatment plant station, as well as in synthetic urine. The water samples were spiked with EE2 at  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The recovery is reported in Table 2, which is found between 96.2% and 109.6%. In addition, Figure 6 compares DPV curves acquired for EE2 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) in plain electrolyte (sodium acetate buffer) and in the synthetic urine. It is observed that in urine, the voltammogram background is upward shifted because of the higher ionic strength of the medium, whereas  $E_{\text{pa}}$  is slightly shifted to lower potential and  $J_{\text{pa}}$  is decreased to less than 5%. Additionally, the oxidation of magnetite to maghemite occurs at lower potential but at much higher current, which has been ascribed to the formation of soluble  $\text{FePO}_4$ . Detection of EE2 have also been conducted in the presence of other estrogens, including estrone, estriol, and estradiol. However, all these estrogens caused a significant interference, because they are oxidized in the same potential range as EE2. As a consequence, the current measured for EE2 oxidation increased to about 113% in the presence of estrone, 129% for estriol, and 60% for estradiol. Despite this drawback, the proposed sensors could be used to detect the total estrogenic concentration, which is in fact more important than simply detecting a single estrogen. In summary, the present method can detect EE2 without the influence of complex matrixes such as drinking and natural waters, as well as synthetic urine.

## Full Paper

## ELECTROANALYSIS

## 4 Conclusions

It has been shown that the combination of iron oxide nanoparticles (ION) and nickel(II) phthalocyanine (NiTsPc) into a supramolecular porous film deposited onto ITO electrodes provides excellent electrocatalytic effect toward oxidation of ethynyl estradiol (EE2). ION and NiTsPc interact by means of Fe(III)–O–Ni(II) bridges beyond simple ion-pairing, which permits the rapid charge-transfer across the electrode, something that is not allowed when ION and NiTsPc are assembled with non-electroactive polymers in separated electrodes. Despite the present sensor exhibits figures of merit comparable to others previously reported in the literature, the ITO/(NiTsPc/ION) electrode is of relative lower cost, its fabrication process is highly reproducible, it can be used for at least seven consecutive measurements while losing less than 3% of sensitivity, and, more importantly, it is not affected by the composition of complex matrixes such as lake water and synthetic urine.

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## References

- [1] H. Kuhl, *Climateric* **2005**, *8*, 3.
- [2] F. F. Sodré, I. C. Pescara, C. C. Montagner, W. F. Jardim, *Microchem. J.* **2010**, *96*, 92.
- [3] K. A. Kidd, P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak, R. W. Flick, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 8897.
- [4] D. L. da Cunha, S. M. C. da Silva, D. M. Bila, J. L. D. Oliveira, P. D. Sarcinelli, A. L. Larentis, *Cad. Saúde Pública* **2016**, *32*, e00056715.
- [5] D. Matejček, V. Kuban, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *588*, 304.
- [6] N. H. Torres, M. M. Aguiar, L. F. R. Ferreira, J. H. P. Americo, A. M. Machado, E. B. Cavalcanti, V. L. Tornisiello, *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, 379.
- [7] P. Hohenblum, O. Gans, W. Moche, S. Scharf, G. Lorbeer, *Sci. Total Environ.* **2004**, *333*, 185.
- [8] M. Hirobe, Y. Goda, Y. Okayasu, J. Tomita, H. Takigami, M. Ike, H. Tanaka, *Water Sci. Technol.* **2006**, *54*, 1.
- [9] E. Souri, H. Jalalizadeh, H. Farsam, R. Ghadiri, M. Amanlou, *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 949.
- [10] M. M. Ngundi, O. A. Sadik, T. Yamaguchi, S. Suye, *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 61.
- [11] R. F. Brocenschi, R. C. Rocha-Filho, L. Li, G. M. Swain, *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *712*, 207.
- [12] M. L. Scala-Benuzzi, J. Raba, G. J. A. A. Soler-Illia, R. J. Schneider, G. A. Messina, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4104.
- [13] M. Nodehi, M. Baghayeri, R. Ansari, H. Veisi, *Mater. Chem. Phys.* **2020**, *244*, 122687.
- [14] F. H. Cincotto, G. Martínez-García, P. Yáñez-Sedeño, T. C. Canevari, S. A. S. Machado, J. M. Pingarrón, *Talanta* **2016**, *147*, 328.
- [15] Z. X. Zheng, M. Wang, X. Z. Shi, C. M. Wang, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14162.
- [16] T. M. Prado, F. H. Cincotto, F. C. Moraes, S. A. S. Machado, *Electroanalysis* **2017**, *29*, 1278.
- [17] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia, *Trac Trend. Anal. Chem.* **2015**, *72*, 1.
- [18] J. M. George, A. Antony, B. Mathew, *Microchim. Acta* **2018**, *185*, 358.
- [19] L. Vayssieres, C. Chaneac, E. Tronc, J. P. Jolivet, *J. Coll. Interface Sci.* **1998**, *205*, 205.
- [20] M. A. G. Soler, *J. Magn. Magn. Mater.* **2018**, *467*, 37.
- [21] C. de L. Ribeiro, J. G. M. Santos, J. R. de Souza, M. A. Pereira-da-Silva, L. G. Paterno, *J. Electroanal. Chem.* **2017**, *805*, 53.
- [22] C. de L. Ribeiro, J. G. M. Santos, J. R. Souza, L. G. Paterno, *J. Solid State Electrochem.* **2019**, *23*, 783.
- [23] R. M. Cornell, U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. Wiley-VCH, Germany, **2003**.
- [24] A. W. Snow, Phthalocyanine Aggregation in *The Porphyrin Handbook* (Eds: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guiard), Elsevier, New York, **2003**, pp. 129–176.
- [25] H. Isago, *Optical Spectra of Phthalocyanines and Related Compounds. A Guide for Beginners*. Springer, Tokyo, **2015**.
- [26] E. F. Perez, L. T. Kubota, A. A. Tanaka, G. de Oliveira-Neto, *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 1665.
- [27] F. N. Crespilho, V. Zucolotto, J. R. Siqueira, A. J. F. Carvalho, F. C. Nart, O. N. Oliveira, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2006**, *1*, 151.
- [28] W. S. Alencar, F. N. Crespilho, M. R. M. C. Santos, V. Zucolotto, O. N. Oliveira, W. C. Silva, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 12817.
- [29] A. R. Hurwitz, S. T. Liu, *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 624.
- [30] AOAC International, *Official methods of analysis in Guidelines for Standard Method Performance Requirements* (Appendix F). AOAC International, **2016**.
- [31] ICH Topic Q2 (R1) *Validation of analytical procedures: text and methodology*, Int. Conf. Harmon 1994, London, **2005**.
- [32] J. J. Triviño, M. Gómez, J. Valenzuela, A. Vera, V. Arancibia, *Sens. Actuators B* **2019**, *297*, 126728.
- [33] N. A. Martínez, S. V. Pereira, F. A. Bertolino, R. J. Schneider, G. A. Messina, J. Raba, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *723*, 27.
- [34] C. Li, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 263.
- [35] C. Perez, F. R. Simões, L. Codognoto, *J. Solid State Electrochem.* **2015**, *20*, 2471.
- [36] V. O. Jesus, V. S. Ferreira, B. G. Lucca, *Talanta* **2020**, *210*, 120610.
- [37] M. K. L. Coelho, D. N. Da Silva, A. C. Pereira, *Chemosensors* **2019**, *7*, 32.
- [38] A. Pavinatto, L. A. Mercante, C. S. Leandro, L. H. C. Mattoso, D. S. Correa, *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *755*, 215.

Received: September 15, 2020

Accepted: October 12, 2020

Published online on ■■■, ■■■

**FULL PAPER**